

Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) til analyse av nye psykoaktive stoffer i blod

Linda Vårdal



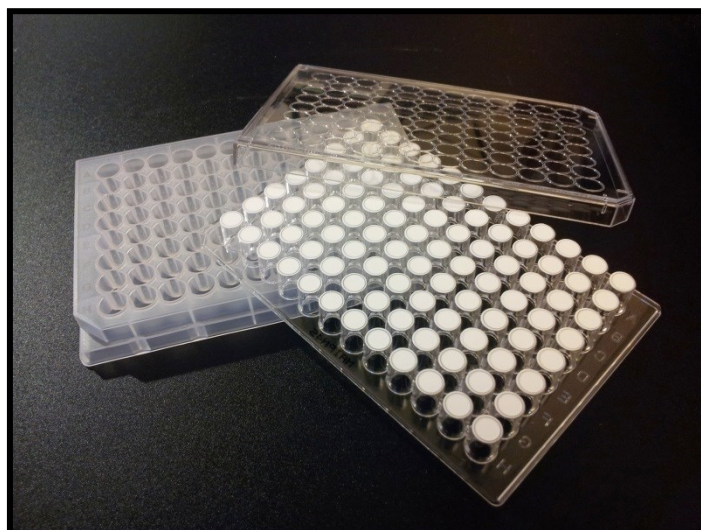
Masteroppgave ved avdeling for farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Avdeling for rusmiddelforskning og metodeutvikling
Divisjon for rettsmedisinske fag
Nasjonalt folkehelseinstitutt

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2014

Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) til analyse av nye psykoaktive stoffer i blod



Veiledere:

Elisabeth Leere Øiestad

Seniorforsker ved avdeling for rusmiddelforskning og metodeutvikling, Nasjonalt folkehelseinstitutt
Førsteamanuensis II ved avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Stig Pedersen-Bjergaard

Professor ved avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Astrid Gjelstad

Førsteamanuensis ved avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Hilde Marie Erøy Edvardsen

MSc pharm, stipendiat ved avdeling for rusmiddelforskning og metodeutvikling, Nasjonalt folkehelseinstitutt

© Linda Vårdal

2014

Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) til analyse av nye psykoaktive stoffer
i blod

Linda Vårdal

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Sammendrag

Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) ble publisert i 2013 og er en ny form for væskefase-mikroekstraksjon (*liquid-phase microextraction*, LPME). Teknikken utføres i et 96-brønnsformat bestående av en bunnplate, organisk væskemembran, mottakerplate og et topplokk. Ekstraksjonen utgjør et trefasesystem tilsvarende tradisjonell væske-væske-ekstraksjon (*liquid-liquid-extraction*, LLE) med tilbakeekstraksjon. Høy grad av selektivitet og lavt forbruk av organisk løsemiddel er gunstige fordeler som gjør teknikken attraktiv å anvende for nye stoffgrupper.

I denne oppgaven har PALME blitt anvendt til prøveoppbehandling av et utvalg nye psykoaktive stoffer (NPS) fra blod. Forekomst og bruk av NPS har tiltatt de siste årene, og helserisikoen stoffene medfører gjør det viktig å utvikle nye og effektive analyseteknikker til sikker påvisning og kvantifisering. Totalt 14 substanser ble testet og de fleste tilhørte én av følgende undergrupper av NPS: fenetylaminer, tryptaminer, piperaziner og syntetiske katinoner. Inkluderte substanser var MDAI, metylon, 5-IT, PFA, alfa-metyltryptamin, mCPP, 6-APB, pentedron, metoksetamin, MDPV, etylfenidat, 2C-E, Bromo DragonFLY og AH-7921. Substansene var basiske aminer med pKa-verdier mellom 7,3 og 10, og log *P* mellom 1,1 og 4,0. Dette ga gode forutsetninger for ekstraksjon med PALME.

Dette var første gang teknikken ble utført med fullblod som analysemedium, og en optimalisering av ekstraksjonen ble utført. Fokus var rettet mot effektivisering og mulighet for rutinemessig og kvantitativ anvendelse av metoden. Det ble testet tilsetning av ulike sluttkonsentrasjoner av NaOH i prøveløsningen (3,0-30 μ M), fire ulike membranvolum (2,0-3,5 μ l), seks ulike organiske løsemidler som organisk væskemembran (diheksyleter, dodecylacetat, nitrofenyloktyleter, isopentylbenzen, heksadekan og nonanon), ulike ekstraksjonstider (15-45 minutter) og ulike volum for mottakerløsningen (50 og 250 μ l). Resultatet bidro til følgende ekstraksjonsprosedyre:

Stoffene ble ekstrahert fra en 250 μ l prøveløsning som bestod av 100 μ l blodprøve, 75 μ l 80 mM NaOH, 50 μ l vann og 25 μ l internstandard. Organisk væskemembran bestod av 3 μ l dodecylacetat, og 20 mM HCOOH ga pH-drevet overgang til 250 μ l mottakerløsning. Ekstraksjonen ble fremmet med risting ved 900 rpm og pågikk i 40 minutter. Analyse ble utført med ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS).

Metodevalideringen innebar evaluering av linearitet, presisjon og nøyaktighet, deteksjons- og kvantifiseringsgrenser, ekstraksjonsutbytte, matrikseffekter, spesifisitet, overdrag og holdbarhet. UHPLC-MS/MS-metoden separerte stoffene tilfredsstillende på i underkant av ni minutter. Vektete lineære standardkurver ($1/x$) ble satt opp i området fra stoffenes kvantifiseringsgrense til øvre konsentrasjon. Standardkurvene hadde r^2 -verdier mellom 0,92 og 0,99. Det ble beregnet et ekstraksjonsutbytte på mellom 11-87 % for samtlige stoffer, unntatt 5-IT, Bromo DragonFLY og 2C-E, hvor ekstraksjonsutbyttet lå på mellom 3-19 %. Det var forholdsvis stor variasjon i ekstraksjonsutbyttet mellom de ulike stoffene, og en viss konsentrasjonsavhengighet ble observert for enkelte. Deteksjonsgrenser ble satt mellom 0,0025-0,50 μM og kvantifiseringsgrenser mellom 0,13-5,0 μM . Valideringen forøvrig viste tilfredsstillende resultat for presisjon, nøyaktighet, matrikseffekter, overdrag og spesifisitet. Holdbarhetstesting viste at ekstraktene var holdbare i opp til syv dager ved -20°C og 10°C .

10 autentiske blodprøver ble analysert ved hjelp av metoden. Målte konsentrasjoner avvirket noe fra tidligere målte konsentrasjoner, men alle konsentrasjonene var i samme størrelsesorden, unntatt AH-7921 og Bromo DragonFLY som så ut til å ha forsvunnet fra prøvene.

Resultatet for de reelle prøvene viste at PALME kunne benyttes til prøveopparbeidelse av NPS fra fullblod, og til en rask prøveopparbeidelse for påvisning (*screening*) av de 14 validerte stoffene. Ved videre optimalisering av betingelser og konsentrasjoner vil det også kunne være mulig å bruke metoden til kvantifisering.

Forord

I forbindelse med denne oppgaven vil jeg rette en stor takk til mine veiledere for uvurderlig veiledning av høyeste kvalitet. **Stig Pedersen-Bjergaard**, som i første omgang ga meg muligheten til å skrive masteroppgave ved den avdelingen på farmasøytisk institutt som jeg ønsket aller mest. Takk for kloke, velgjennomtenkte og konkrete tilbakemeldinger. **Astrid Gjelstad**, som har en egen evne til å se hvordan alle ting kan gjøres ett hakk bedre. Takk for verdifulle tilbakemeldinger. **Hilde Marie Erøy Edvardsen**, som jeg i en periode var så heldig å få dele kontor med på Folkehelseinstituttet. Takk for alle samtaler, både faglige og mindre faglige (☺). Takk for at du har vist interesse utover det formelle, samtidig som du har vært til stor hjelp både i faglige og praktiske spørsmål. Og sist, men ikke minst; **Elisabeth Leere Øiestad**, som har vært til stede i det daglige på Folkehelseinstituttet. Takk for din engasjerende personlighet som inspirerer til å nå nye høyder, din evne til å være profesjonell pådriver samtidig som forståelsesfull støttespiller, og for din enorme kapasitet til å sette deg inn i mine tanker og spørsmål, til tross for en arbeidshverdag de færreste ville makte. Jeg er også glad for at det er «to av deg». En stor takk til Åse Marit for blant annet uvurderlig excel-hjelp i forbindelse med metodevalideringen.

Takk til Petra, som har vært masterstudent sammen med meg på Folkehelseinstituttet. Det har vært fint å ha en i samme situasjon til å diskutere ulike problemstillinger med. Du imponerer med alt du får til. Takk også til alle ansatte på Folkehelseinstituttet som jeg har vært så heldig å få bli litt kjent med. Alle «Hei!» og smil – og «Ingen spørsmål er dumme!» – har blitt satt stor pris på. Jeg kommer til å savne dere alle sammen.

Takk til studievenninnene mine som jeg blant annet har kunnet dele gleder og sorger med i løpet av masteroppgaven. Dere er venner for livet!

Til sist; takk til **mamma** og **pappa**, som aldri lar meg glemme hvor verdien min ligger. Takk for den uendelige kjærligheten og omsorgen som alltid er uavhengig av hva jeg presterer. Dere er mine aller største forbilder.

Oslo, mai 2014

Linda

Innholdsfortegnelse

Forkortelser	1
1 Innledning.....	5
1.1 Bakgrunn	5
1.2 Hensikt.....	8
2 Teori	9
2.1 Nye psykoaktive stoffer (NPS).....	9
2.1.1 Fenetylaminer.....	12
2.1.2 Tryptaminer.....	12
2.1.3 Piperaziner.....	13
2.1.4 Syntetiske katinoner	14
2.2 Blodfysiologi	15
2.2.1 Fullblod som analysemedium.....	15
2.3 Prøveopparbeidelse.....	16
2.3.1 Væske-væske-ekstraksjon (LLE)	17
2.3.2 Væskefase-mikroekstraksjon (LPME)	18
2.3.3 Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction (PALME)	19
2.4 Væsekromatografi (LC).....	21
2.4.1 Omvendt-fase-kromatografi	21
2.4.2 Ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)	22
2.5 Massespektrometri (MS)	23
2.5.1 Elektrosprayionisering (ESI).....	24
2.5.2 Tandem massespektrometri (MS/MS)	25
2.5.3 Væsekromatografi koblet med tandem massespektrometri (LC-MS/MS).....	27
3 Materiale og metode.....	28
3.1 Analyttkarakteristikk	28
3.2 Utstyr	30
3.3 Kjemikalier	31
3.4 Løsninger.....	32
3.4.1 Stamløsninger.....	32
3.4.2 Arbeidsløsning	32
3.4.3 Standarder og kontroller.....	33

3.4.4	Internstandarder.....	35
3.4.5	Biologiske prøveløsninger.....	36
3.5	Autentiske prøver	36
3.6	Instrumentelle betingelser.....	37
3.6.1	UHPLC-betingelser	37
3.6.2	MS/MS-betingelser	38
3.7	Utførelse av PALME	41
3.7.1	Ekstraksjon fra vandige prøveløsninger	41
3.7.2	Ekstraksjon fra tilsatt 0-blod (biologiske prøveløsninger)	42
3.7.3	Ekstraksjon fra autentiske prøver	44
3.8	Forsøksoppsett ved optimalisering av ekstraksjonsparametere.....	45
3.8.1	Linearitet og ekstraksjonsutbytte fra vandige prøveløsninger	45
3.8.2	Organisk væskemembran	46
3.8.3	Ekstraksjonstid	47
3.8.4	Basetilsetning (pH i prøveløsningen).....	47
3.8.5	Volum av mottakerløsning ved bruk av multikanalpipette	47
3.8.6	Testing av overdrag mellom brønnene under ekstraksjon	48
3.9	Validering av metoden.....	49
3.9.1	Metodedokumentasjon	49
3.9.2	Identifikasjon.....	49
3.9.3	Linearitet	49
3.9.4	Presisjon og nøyaktighet	49
3.9.5	Minste detekterbare konsentrasjon (MDK).....	50
3.9.6	Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK).....	50
3.9.7	Retensjonstidsstabilitet for internstandarder	50
3.9.8	Ekstraksjonsutbytte	51
3.9.9	Matrikseffekter	51
3.9.10	Spesifisitet	52
3.9.11	Overdrag i LC-MS/MS.....	55
3.9.12	Holdbarhet.....	55
4	Resultater og diskusjon	56
4.1	Optimalisering av ekstraksjonsparametere.....	56
4.1.1	Linearitet og ekstraksjonsutbytte fra vandige prøveløsninger	56

4.1.2	Organisk væskemembran	59
4.1.3	Ekstraksjonstid	63
4.1.4	Basetilsetning (pH i prøveløsningen)	64
4.1.5	Volum av mottakerløsning ved bruk av multikanalpipette	65
4.1.6	Testing av overdrag mellom brønnene under ekstraksjon	66
4.2	Validering av metoden.....	67
4.2.1	Identifikasjon.....	67
4.2.2	Linearitet	69
4.2.3	Presisjon og nøyaktighet	72
4.2.4	Minste detekterbare konsentrasjon (MDK).....	76
4.2.5	Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK).....	77
4.2.6	Retensjonstidsstabilitet for internstandarder	79
4.2.7	Ekstraksjonsutbytte	79
4.2.8	Matrikseffekter	81
4.2.9	Spesifisitet	82
4.2.10	Overdrag i LC-MS/MS.....	83
4.2.11	Holdbarhet.....	84
4.3	Autentiske prøver	85
5	Avsluttende bemerkninger	90
6	Konklusjon	92
	Litteraturliste	94
	Vedlegg	99

Forkortelser

µg	mikrogram
µl	mikroliter
µM	mikromolar = nmol/ml
2C-B	4-bromo-2,5-dimetoksyfenetylamin
2C-E	4-etyl-2,5-dimetoksyfenetylamin
5-IT	5-(2-aminopropyl)indol
6-APB	6-(2-aminopropyl)benzofuran («Benzo Fury»)
AH-7921	3,4-diklor-N-[(1-dimetylamino)sykloheksylmetyl]benzamid
Alfa-metyltryptamin	3-(2-aminopropyl)indol (AMT)
Amfetamin	1-fenyl-2-aminopropan
Bromo DragonFLY	1-(8-bromobenzodifuran-4-yl)-2-aminopropan
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
EMCDDA	<i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ESI	<i>electrospray ionization</i> / elektrosprayionisering
Etylfenidat	etylfenyl(piperidin-2-yl)acetat
EU	<i>European Union</i> / Den europeiske union
EWS	<i>early warning system</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FHI	Nasjonalt folkehelseinstitutt (Folkehelseinstituttet)

HCOOH	maursyre
HETP	høydeekvivalenten til en teoretisk plate
HF-LPME	<i>hollow-fiber liquid-phase microextraction</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IS	internstandard
kV	kilovolt
LC	<i>liquid chromatography</i> / væskekromatografi
LC-MS/MS	væskekromatografi koblet med tandem massespektrometri
LLE	<i>liquid-liquid-extraction</i> / væske-væske-ekstraksjon
LOD	<i>limit of detection</i> / deteksjonsgrense
log <i>P</i>	fordelingskoeffisient mellom oktanol og vann
LOQ	<i>limit of quantification</i> / kvantifiseringsgrense
LPME	<i>liquid-phase microextraction</i> / væskefase-mikroekstraksjon
m ² /g	kvadratmeter per gram
mCPP	1-(3-klorofenyl)piperazine
MDA	3,4-metylendioksyamfetamin
MDAI	5,6-metylendioksy-2-aminoindan
MDEA	3,4-etylendioksyetylmetamfetamin
MDK	minste detekterbare konsentrasjon
MDMA	3,4-metylendioksyetamfetamin (ecstasy)
MDPV	3,4-metylendioksyprovaleron

ME	matrikseffekter
Membran 1	diheksyleter
Membran 2	diheksyleter + 2 % trioktylamin
Metamfetamin	n-metyl-1-fenyl-propan-2-amin (metylamfetamin)
Metoksetamin	2-(3-metoksyfenyl)-2-(etylaminosykloheksanon
Metylon	3,4-metylendioksy-N-metylkatinon
mg	milligram
MKK	minste kvantifiserbare konsentrasjon
ml	milliliter
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	<i>mass spectrometry</i> / massespektrometri
MS/MS	<i>tandem mass spectrometry</i> / tandem massespektrometri
m/z	forholdet mellom masse og ladning
NaOH	natriumhydroksid
ng	nanogram
NPS	<i>new psychoactive substances</i> / nye psykoaktive stoffer
PALME	<i>parallel artificial liquid membrane extraction</i>
Pentedron	2-(metylaminosykloheksanon)-1-fenylpentanon (α -metylaminovalerofenon)
PFA	4-(para)-fluoramfetamin
Pluno	<i>partial loop with needle overfill</i>
PMA	para-metoksyamfetamin

PMMA	para-metoksymetylamfetamin
PP	<i>protein precipitation</i> / proteinfelling
PVDF	polyvinylidenfluorid
Q	kvadrupol
r^2	korrelasjonskoeffisient
RF	radiofrekvens
rpm	<i>revolutions per minute</i> / omdreininger per minutt
RSD	relativt standardavvik
SD	standardavvik
S/N	<i>signal-to-noise-ratio</i> / signal-til-støy-forhold
SDME	<i>single-drop liquid-phase microextraction</i>
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
SIRUS	Statens institutt for rusmiddelforskning
SPE	<i>solid-phase extraction</i> / fast-fase-ekstraksjon
SPME	<i>solid-phase microextraction</i> / fast-fase-mikroekstraksjon
Std	standard
TIC	<i>total ion current</i>
UHPLC	<i>ultra-high performance liquid chromatography</i>
UNODC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>
UPLC	<i>ultra performance liquid chromatography</i>

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Analyse av biologiske medier som plasma, spytt, blod og urin m.fl. innen terapikontroll, rusmiddelkontroll, rettstoksikologi og dopingkontroll kan være utfordrende fordi mediene ofte er svært komplekse. Utfordringene skyldes hovedsakelig matrikskomponenter [1]. Disse endogene substansene kan påvirke analyttens signal og i verste fall ødelegge analysesystemet. En annen utfordring innen biologisk analyse er at analytt ofte foreligger i så lav konsentrasjon at oppkonsentrering blir en forutsetning for deteksjon. Disse faktorene gjør at en god prøveopparbeidelse ofte er nødvendig før analyse. Prøveopparbeidelsen skal sikre at prøven er kompatibel med analyseinstrumentet, at analytten som skal bestemmes er til stede i høy nok konsentrasjon og at interfererende substanser fra prøvematriks blir rensset bort [2].

I de siste årene har væskekromatografi koblet med tandem massespektrometri (LC-MS/MS) utgjort gullstandarden i biologisk analyse. Tandem massespektrometrisk deteksjon (MS/MS) har blitt tilregnet svært høy selektivitet, selv ved analyse av komplekse matrikser som fullblod. Det er derfor viktig å kjenne til at LC-MS/MS-analyse er særskilt utsatt for matrikseffektsforstyrrelser i analysen.

Eksakt mekanisme bak matrikseffektene er ikke kjent, men en generell teori er at det skyldes konkurranse mellom analytt og koeluerende matrikskomponent om ionisering i grensesnittet mellom væskekromatograf og inngangen til massespektrometeret [3]. Dette påvirker signalet i detektoren [4] i form av ioneundertrykkelse eller forsterket ioneintensitet [3]. Forstyrret signal kan føre til unøyaktige analyser og feilestimerte resultater [1], noe som er særlig negativt innen dopingkontroll og rettstoksikologiske analyser der positive analyseresultat kan medføre negative sanksjoner.

Prøveopparbeidelse kan redusere matrikseffekter betraktelig [5]. Dette er gunstig, men gode prøveopparbeidelsesmetoder er ofte tidkrevende i den totale analysesammenheng. Prøveopparbeidelsen blir et hastighetsbestemmende trinn, og den er blitt tilregnet et gjennomsnittlig tidsbruk på 61 % av total analysetid [6]. Forenkling og effektivisering av tradisjonelle metoder har derfor vært av stor interesse de siste årene.

Væske-væske-ekstraksjon (LLE), fast-fase-ekstraksjon (SPE) og proteinfelling (PP) har lenge utgjort de vanligste prøveopparbeidelsesteknikkene [7-9].

Prøveopparbeidelse i form av ekstraksjon er basert på fordelingen av stoffer mellom to ulike faser. I væskeekstraksjon er stoffene fordelt mellom en vandig og en organisk væskefase. LLE er en tradisjonell og mye anvendt teknikk innen biologisk analyse, men forbindes med utfordringer som høyt forbruk av organiske løsemidler og stort tidsforbruk, i tillegg til at den er vanskelig å automatisere [2]. Dette gjør utvikling av nye former for LLE attraktivt.

Ekstraksjon ved bruk av svært små volum, mikroekstraksjon, er en spennende videreutvikling av LLE. Første publikasjon er fra 1996 og beskriver et oppsett hvor analytten ekstraheres fra en vandig prøveløsning og over i en dråpe av organisk løsemiddel hengende ytterst på spissen av en sprøytekanyle. Teknikken er kjent som *single-drop liquid-phase microextraction* (SDME). Overføring av analytt skjer ved passiv diffusjon, og ved endt ekstraksjon trekkes dråpen inn i sprøyten og klargjøres for analyse. Teknikken gir høy grad av oppkonsentrering og lite forbruk av organisk løsemiddel, men er lite robust ettersom den organiske dråpen er lett å miste [10].

En videreutvikling av SDME er den mer robuste hulfiber-teknikken, kjent som *hollow-fiber liquid-phase microextraction* (HF-LPME). Denne teknikken ble første gang beskrevet i 1999 av Pedersen-Bjergaard og Rasmussen. En liten mengde organisk løsemiddel inkorporeres i en porøs hulfiber av polypropylen. Hulfiberen senkes ned i en vandig prøveløsning, som også blir kalt donorfase. Ekstraksjonen utføres i et tofase- eller et trefasesystem. Tofasesystemet ekstraherer analytt over til en organisk mottakerløsning inne i hulfiberen. Trefasesystemet ekstraherer analytt gjennom en organisk fase og over i en vandig mottakerløsning. HF-LPME gir høy grad av opprensing og oppkonsentrering, i tillegg til lavt forbruk av organisk løsemiddel [11]. Bruk av LPME har fordeler som rene ekstrakter, kompatibilitet med væskechromatografi (LC), og teknikken kan benyttes for stoffer med ulike kjemiske egenskaper [12-14]. Suksessfull ekstraksjon har blitt utført fra matrikser som fullblod, plasma, spytt, urin og brystmelk [15-18]. En ulempe er imidlertid den relativt lange ekstraksjonstiden, som varierer fra 15 til 60 minutter [19], i tillegg til at det er vanskelig å ekstrahere mange prøver parallelt.

I 2006 ble konseptet elektromembranisolering (EMI) publisert [20], senere kjent som elektromembranekstraksjon (EME). Dette har gitt oppsiktsvekkende resultater som 6-17

ganger raskere ekstraksjoner, sammenlignet med LPME [21]. EMI og EME utføres med et pålagt elektrisk potensial over væskemembranen som drivkraft for ekstraksjonen, i stedet for en pH-gradient.

I 2013 ble en modifisert utgave av HF-LPME, *parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME) publisert av Gjelstad, Pedersen-Bjergaard og Rasmussen [22]. PALME ble utført i et 96-brønnsformat, hvor hulfiberen i HF-LPME var erstattet med flate membraner av polypropylen. Dette muliggjorde ekstraksjon av opp til 96 prøver samtidig. Teknikken ga gunstige fordeler som høy kapasitet, i tillegg til lavt forbruk av organisk løsemiddel, noe som gjør det attraktivt å anvende PALME til prøveopparbeidelse ved analyse av nye stoffgrupper.

Det er kun publisert én artikkel om PALME-ekstraksjon. Fire basiske legemidler (petidin, nortriptylin, metadon og haloperidol) ble ekstrahert fra plasma. Ekstraksjon og analyse med LC-MS/MS ga ekstraksjonsutbytte på 34-74 %, kvantifiseringsgrenser på 0,010-0,35 ng/ml og $r^2 > 0,9955$ med relative standardavvik (RSD) på under 12 % for samtlige stoffer [22].

I denne oppgaven benyttes PALME for første gang til prøveopparbeidelse av 14 utvalgte stoffer tilhørende en stoffgruppe som ikke bare er ny for PALME, men som representerer et aktuelt og skremmende samfunnsproblem; nye psykoaktive stoffer (NPS). Forekomst og bruk av NPS har tiltatt de siste årene, og det internasjonale systemet for legemiddelkontroll har nå problemer med å holde tritt med utviklingshastigheten og kreativiteten bak produksjonen og bruken. NPS er en samlebetegnelse for stoffer som ligner i struktur eller virkning på allerede kontrollerte stoffer, men de er ofte ikke underlagt regulatorisk kontroll selv ennå [23]. Det er kjent at slike NPS kan utgjøre en stor helserisiko [24]. Tiltak som kan bidra til å identifisere og stanse salg og bruk bør prioriteres. Nye og mer effektive retts toksikologiske analyseteknikker er eksempler på slike tiltak.

Ved Nasjonalt folkehelseinstitutt (FHI) analyseres et bredt spekter av NPS i blod, spytt og urin, men som en følge av den store tilveksten av nye stoffer er det mange NPS som ikke inngår i standard analyseprogram. Spesialanalyser for et bredere utvalg utføres eksempelvis ved dødsfall hvor det er spesifikk mistanke om inntak av ukjente stoffer, men det vil alltid være en underestimering av den reelle forekomsten [25].

I litteraturen beskrives tandem massespektrometrisk deteksjon med forutgående separasjon i form av væskekromatografi (LC-MS/MS), gasskromatografi (GC-MS/MS) eller

kapillærelektroforese (CE-MS/MS) som analysemetoder for ulike NPS. Analysene er utført fra matrikser som blod, serum, urin [26] og spytt [27]. Det er også beskrevet en retrospektiv studie, med en tottrinns ekstraksjonsprosedyre av hår etterfulgt av LC-MS/MS-analyse [28]. Ulike teknikker for prøveopparbeidelse er beskrevet [26], blant annet *dilute and shoot*, PP, LLE, SPE og *on-line*-SPE.

Flere begrensninger ved dagens metoder gjør at det er behov for økt screeningkapasitet i toksikologiske laboratorier, i tillegg til utvikling av raske, fleksible og spesifikke metoder som kan identifisere, og kanskje også kvantifisere, nye substanser i biologiske medier [29].

1.2 Hensikt

Hensikten med oppgaven var å benytte den nye mikroekstraksjonsteknikken PALME til prøveopparbeidelse og bestemmelse av et utvalg substanser fra stoffgruppen NPS i fullblod. Følgende substanser var inkludert: MDAI, metylon, 5-IT, PFA, alfa-metyltryptamin, mCPP, 6-APB, pentedron, metoksetamin, MDPV, etylfenidat, 2C-E, Bromo DragonFLY og AH-7921. Flertallet av de 14 substansene er såkalte syntetiske amfetaminer tilhørende én av følgende undergrupper av NPS: tryptaminer, fenetylaminer, piperaziner og syntetiske katinoner. Unntakene er AH-7921, som er et syntetisk opioid, og metoksetamin som er et arylsykloheksylamin [30]. Klassifiseringen er presentert i **Tabell 3.1**.

Punktvis fremstilling av hensikten med oppgaven

- Anvende PALME for en ny stoffgruppe: nye psykoaktive stoffer (NPS)
- Ekstrahere stoffene fra fullblod
- Analysere ekstraktene med UHPLC-MS/MS
- Optimalisere ekstraksjonen
- Validere metoden
- Ekstrahere og analysere autentiske prøver
- Vurdere metodens mulighet for kvantitativ anvendelse

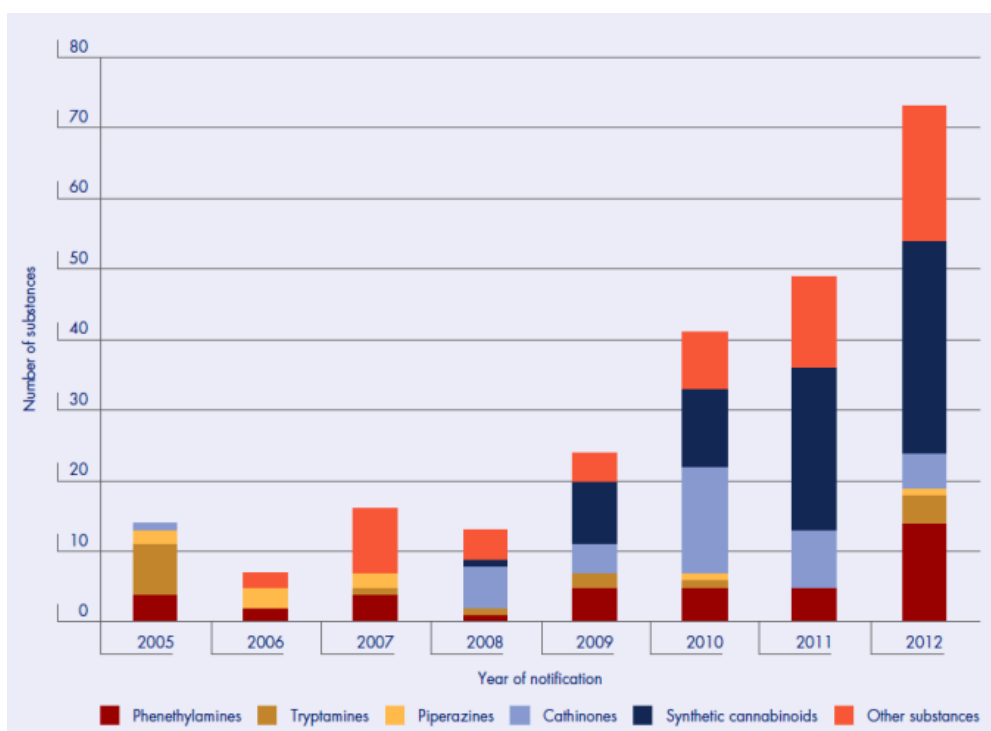
2 Teori

2.1 Nye psykoaktive stoffer (NPS)

Begrepet *legal highs* har blitt brukt om NPS inntil nylig. Kritikk mot begrepet har ført til at stoffene heller blir omtalt som *nye psykoaktive stoffer* for å unngå den misvisende karakteren til det først brukte begrepet [31]. Mange av stoffene er ikke nyutviklede, men kalles likevel nye fordi de nylig er ankommet markedet som misbruksstoffer [32].

Psykoaktive stoffer som omgår lovverket har blitt utviklet, markedsført og solgt i lang tid. Likevel har det blitt observert urovekkende endringer de siste årene; økt mangfold og farmakologisk potens, i tillegg til økt globalisering som følge av salg over internett [31].

Europa har hatt en særlig stor økning i forekomst [31]. I løpet av 2012 ble det oppdaget over 70 NPS via varslingsystemet som er utviklet av EU [25], en markant økning fra 2011 hvor det ble oppdaget 49 NPS [33]. **Figur 1** viser antall nye registrerte stoffer innenfor ulike grupper NPS i perioden 2005-2012.



Figur 1: Antall nye NPS registrert av EUs narkotikaovervåkingssenter: *European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction* (EMCDDA) i perioden 2005-2012 [34]

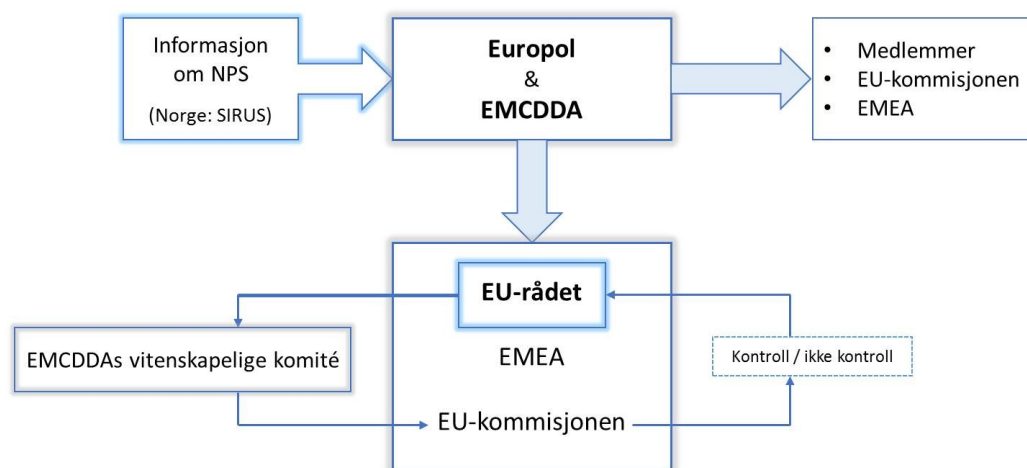
Økningen skyldes i stor grad den omfattende internettomsetningen, hvor stoffene ofte selges som harmløse hverdagsprodukter, for eksempel som badesalt [28]. Dette er svært misvisende fordi flere av stoffene er mer giftige og potente enn de kontrollerte stoffene de etterligner, men kan i enkelte tilfeller ha en mer langsomt innsettende effekt. Den langsomt innsettende effekten kan medvirke til økt inntak og i verste fall dødelig overdose [25]. Identifisering av NPS er derfor en viktig, men utfordrende oppgave, særlig fordi det stadig kommer nye produkter på markedet med varierende sammensetning og merking. Ved rettslig identifisering og kvantifisering av NPS er det også behov for sertifiserte referansesubstanser. Et etterslep mellom produsentene av referansestoffene og analyselaboratoriene oppstår fordi produsentene avventer produksjon til et kommersielt behov er oppdaget. Laboratoriene har ikke mulighet til å gi uttrykk for behov før de har blitt klar over hvilke stoffer som skal identifiseres [35]. Dette skaper en forsinkelse i arbeidet. I tillegg foreligger det få kliniske og vitenskapelige data [28], og dermed stor usikkerhet med tanke på toksisitet, avhengighet og langtidsbruk [31].

NPS omfatter som nevnt ulike undergrupper, hvorav de største er syntetiske cannabinoider og katinoner [29]. Undergruppene som er representert i denne oppgaven beskrives i avsnitt 2.1.1-4. Fenetylaminer ble syntetisert allerede på 1960-tallet. Det ble imidlertid observert en økning for gruppen rundt 1990. En tilsvarende økning er sett for tryptaminer de siste fem årene. Økningen skyldes en kombinasjon av et mer globalt marked og mye tilgjengelig litteratur, inkludert PiHKAL fra 1991 [36] og TiHKAL fra 1997 [37]. Bøkene beskriver henholdsvis syntesen av flere ulike fenetylaminer og tryptaminer. Muligheten for å tjene penger har gjort dette interessant for både legale og illegale synteselaboratorier. Stoffgruppen piperaziner kom til Europa rundt 2004, og syntetiske katinoner gjorde seg gjeldende rundt 2008 [32].

Varslingssystemer

Ulike kontrollsystemer har blitt utviklet i forskjellige land for å oppdage forekomst og bruk av NPS. I 2005 utviklet Den europeiske union (EU) det regionale *early warning system* (EWS) med de nasjonale kontrollsystemene som grunnlag [31]. Norge er ikke medlem av EU, men har en samarbeidsavtale om medlemskap i EUs narkotikaovervåkingssenter (EMCDDA). Statens institutt for rusmiddelforskning (SIRUS) fungerer som koordinator for dette samarbeidet [25].

EUs varslingsystem er vist i **Figur 2**. Medlemmer formidler informasjon om NPS til Europol, som er EUs organisasjon for politisamarbeid innen kriminaletterretning [38]. Europol og EMCDDA samler og videreformidler informasjonen til medlemmer, EU-rådet, EU-kommisjonen og det europeiske legemiddelbyrå (EMA). Dersom EU-rådet mener at innrapportert substans krever mer utredning blir en rapport utarbeidet av EMCDDAs vitenskapelige komité og sendt til EU-kommisjonen som vurderer om de vil foreslå for EU-rådet at substansen underlegges kontroll, eller ikke [39].



Figur 2: Flytskjema for EUs *early warning system*

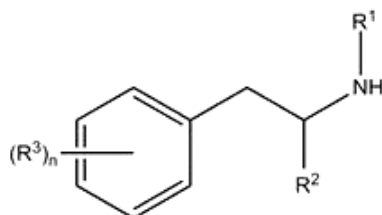
Prosessen beskrevet i forrige avsnitt er ofte langvarig. Som følge av dette er det flere land som har tatt i bruk et såkalt *generisk system* for å kunne kontrollere nye substanser som ligner allerede kontrollerte substanser, uten å måtte ty til en lovgivende reform [39]. Kontrollerte substanser er de som er oppført i narkotikalistene.

Norske legemiddelmyndigheter praktiserer også generisk listeføring. Det innebærer at et stoff som oppfyller strukturkravene i narkotikaforskriften automatisk blir ansett som narkotika. I tillegg er førstegangsbehandlingen av en kommende destruksjonshjemmel gjennomført i Stortinget. Formålet med hjemmelen er å redusere antall ulovlige forsendelser ved å gi hjemmel til å beslaglegge og destruere legemidler som er importert i strid med legemiddellovens § 13. Legemiddelverket opplyser i den forbindelse om et viktig moment: nesten uten unntak er alle psykoaktive stoffer å anse som legemidler, selv om de ikke er oppført på narkotikalistene. Lovlig innføring er dermed ikke en selvfølge, da legemidler som handles på nett må ha markedsføringstillatelse i Norge [25].

Blant denne oppgavens testsubstanser er metylon, PFA, mCPP, pentedron, MDPV og 2C-E oppført på narkotikalisten, jf. narkotikaforskriften [40]. I tillegg ble det nylig foreslått i en høringsuttalelse at 5-IT, metoksetamin og AH-7921 skal oppføres på narkotikalisten [30].

2.1.1 Fenetylaminer

Fenetylaminer er stoffer med dokumenterte psykoaktive og stimulerende effekter. Stoffgruppen inkluderer amfetamin, metamfetamin og MDMA (ecstasy), i tillegg til benzodifuraner (FLY-forbindelser), og den ringsubstituerte 2C-serien. Effekten er doseavhengig; stimulerende effekt ved lave doser og hallusinogen effekt ved høye doser. Rapporterte bivirkninger er agitasjon, takykardi, epileptisk anfall, hallusinasjoner og lever- og nyresvikt [39]. Fenetylaminer omsettes som regel i form av tabletter, men FLY-forbindelsene blir som oftest solgt i pulverform. Stoffene inntas vanligvis ved svelging [39]. Detaljert beskrivelse av syntesen for ulike fenetylaminer er beskrevet i litteraturen [36]. Generell struktur for fenetylaminer er vist i **Figur 3**.



Figur 3: Generell struktur for fenetylaminer [40]

R^1 = H, alkyl, 2-metoksybenzyl

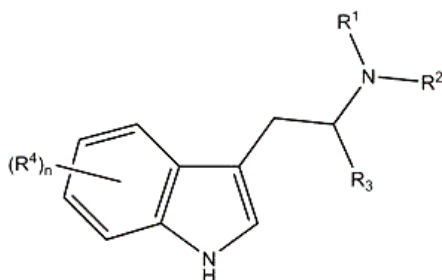
R^2 = H, metyl, etyl

R^3 = én eller flere alkyl-, alkoksy-, alkandiylobis(oksy)- eller halogensubstituenten og eventuelt ytterligere et antall monovalente substituenten

2.1.2 Tryptaminer

Tryptaminer er en stoffgruppe som hovedsakelig består av psykoaktive hallusinogener. I tillegg omfatter gruppen naturlig forekommende nevrottransmittere som serotonin og melatonin, og farmasøytiske substanser som sumatriptan og zolmitriptan mot migrene. Bruken av tryptaminer har til nå vært begrenset, men det er som nevnt blitt observert en økning de siste fem årene. Det foreligger få toksikologiske studier, men rapporterte bivirkninger er blant annet rastløshet, agitasjon, gastrointestinale plager og muskelspenninger

[39]. Naturlige tryptaminer finnes tilgjengelige som tørket sopp. Syntetiske tryptaminer selges som kapsler, tabletter, pulver og væske. De svelges, sniffes, røykes eller injiseres [39]. Detaljert beskrivelse av syntesen for ulike tryptaminer er beskrevet i litteraturen [37]. Generell struktur for tryptaminer er vist i **Figur 4**.



Figur 4: Generell struktur for tryptaminer [40]

$R^1 = \text{H, alkyl}$

$R^2 = \text{alkyl}$

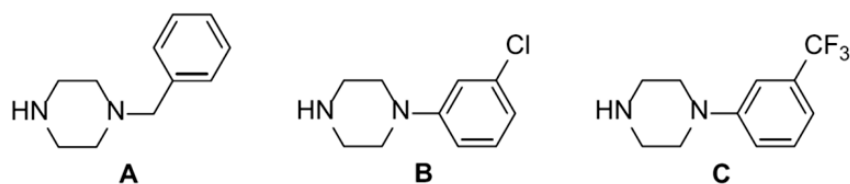
$R^3 = \text{H, alkyl}$

$R^4 = \text{H, eller én eller flere hydroksy-, alkoksy- eller acetoksygrupper}$

2.1.3 Piperaziner

Stoffgruppen piperaziner inneholder flere stoffer som i utgangspunktet var tiltenkt som medikamentell behandling, blant annet mot depresjon. Ingen piperaziner har kommet på markedet med dette tilsiktede formålet.

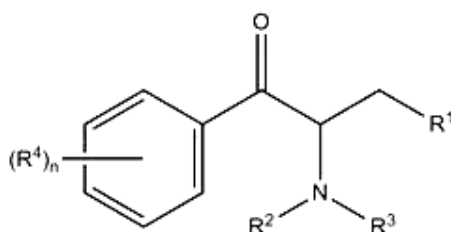
Flere nye medlemmer av gruppen har blitt identifisert det siste tiåret. Den stimulerende effekten er et resultat av dopaminerge, noradrenerge og serotonerge effekter i hjernen. Det er forsket lite på korttids- og langtidseffekter ved bruk av piperaziner. Toksikologisk profil er beskrevet ut fra brukerrapporter, dyrestudier og klinisk observasjon. Den toksiske effekten har store likheter med den toksiske effekten av amfetamin og andre sympatomimetika, men dyrestudier har vist at piperaziner er mindre potente enn amfetamin. Piperaziner selges ofte som (falsk) ecstasy; tabletter med logo tilsvarende ekte ecstasy, kapsler og pulver, men uten ecstasy som virkestoff. Væskeform er sjelden. Stoffene inntas vanligvis ved svelging, men injeksjon, røyking og sniffing forekommer også [39]. Kjemisk struktur for tre ulike piperaziner er vist i **Figur 5**.



Figur 5: Kjemisk struktur av A = benzodiazepin (BZP), B = mCPP, C = trifluormetylfenylpiperazin [39]

2.1.4 Syntetiske katinoner

Syntetiske katinoner er derivater av katinon som er det viktigste innholdsstoffet i *khat*. Katinon og dets derivater er strukturelt relaterte til stoffgruppen fenetylaminer. Derivatene karakteriseres av en β -ketongruppe på sidekjeden av fenetylaminet (**Figur 6**). Eksakt virkningsmekanisme er ikke kjent, men stoffene er likevel kjent for å gi en lignende stimulerende effekt som kokain, amfetamin og MDMA (ecstasy) [39]. Det foreligger lite klinisk forskning med tanke på misbrukspotensial og toksisitet. Hjerterelaterte, psykiatriske og nevrologiske bivirkninger er oppgitt på grunnlag av brukerrapporter og klinisk observasjon. Syntetiske katinoner selges som pulver, tabletter, kapsler og badesalt. Stoffene inntas vanligvis ved svelging [39].



Figur 6: Generell struktur for syntetiske katinoner [40]

R^1 = H, alkyl

R^2 = H, alkyl, aryl, arylalkyl

R^3 = H, alkyl, dialkyl

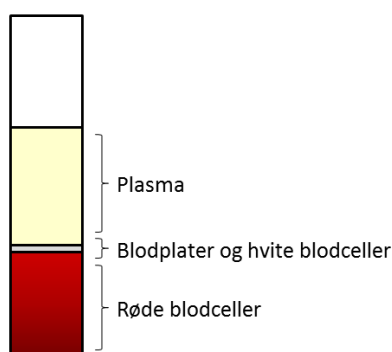
R^4 = H (uten andre substituenten på benzenringen) eller én eller flere alkyl-, alkoksy-, alkandiylobis(oksy)-, halogenalkyl eller halogen og eventuelt ytterligere et antall monovalente substituenten

2.2 Blodfysiologi

Kunnskap om blodets sammensetning, egenskaper og funksjoner er viktig for å kunne prøveopparbeide og analysere blodprøver.

Fullblod er en kompleks blanding av flere celletyper. Hovedtypene er røde blodceller (erytrocytter), hvite blodceller (leukocytt) og blodplater (trombocytter). Andelen røde blodceller utgjør over 90 % og er hovedårsaken til blodets relativt høye viskositet. Hovedoppgaven til de røde blodcellene er å transportere oksygen (O_2), og mengden røde blodceller er direkte relatert til blodets oksygenkapasitet [41].

Blodcellene er vanligvis jevnt fordelt i ekstracellulærvæsken plasma fordi blodet stadig er i bevegelse. Blodcellene synker derimot i stillestående plasma, utenfor kroppen, som følge av større massetetthet. Av samme grunn danner sentrifugert fullblod tre lag (**Figur 7**). Blodcellene utgjør vanligvis litt under halvparten av totalt blodvolum. Plasma består av cirka 7 % plasmaproteiner, som i likhet med erytrocyttene bidrar til blodets viskositet [41].



Figur 7: Sentrifugert fullblod, modifisert fra [41]

2.2.1 Fullblod som analysemedium

Fullblod representerer et av de mest komplekse mediene innen rus- og legemiddelanalyse. Mange matrikskomponenter er til stede og kan interferere med responsen i analyseinstrumentet. Serumproteiner kan ved uspesifikk binding til analytt bidra til redusert sensitivitet, endogene fosfolipider kan gi betydelige matrikseffekter ved LC-MS-analyse og antikoagulanter som tilsettes for å hindre koagulasjon kan påvirke ved ekstraksjon og LC-MS/MS-analyse [1].

For de fleste stoffer reduseres blodkonsentrasjonen raskt etter inntak. Kvantifisering av stoffer i blod tyder derfor ofte på nylig inntak eller inntak av toksiske og/eller fatale doser [42].

Obduksjonsblod

Sammensetningen i obduksjonsblod er annerledes enn sammensetningen i blod fra levende personer. Vanninnhold og pH i obduksjonsblod avviker fra vanlige fysiologiske verdier. Umiddelbart etter dødens inntreden forekommer en rask reduksjon i pH ($<5,5$), men etter hvert som proteiner brytes ned stiger pH igjen. Obduksjonsprøver er ofte hemolyserte, kan være råtne og er svært komplekse blandinger. Blodet kan også være totalt eller delvis koagulert, som videre påvirker deteksjonsgrensen for stoffene som skal analyseres [42].

Stedet i kroppen som blodprøven er hentet fra er av stor betydning i postobduksjonsanalyse. Årsaken til dette er konsentrasjonsforskjeller som følge av distribusjon og redistribusjon, selv etter dødens inntreden [42]. Dette kalles postmortal redistribusjon, og må tas hensyn til ved fortolkning av analyseresultatet.

2.3 Prøveopparbeidelse

Det finnes ulike teknikker for prøveopparbeidelse, men felles hensikt er å klargjøre en prøve for analyse. Behovet for prøveopparbeidelse bestemmes av prøvens kompleksitet, analyttens egenskaper, konsentrasjon i prøven og hvilken analyseteknikk som benyttes. I biologiske analyser er, som nevnt tidligere, prøvene ofte svært komplekse blandinger som kan føre til matrikseffekter i analyseinstrumentet. Matrikskomponentene kan i verste fall ødelegge analysesystemet. Som nevnt kan også konsentrasjon av analytt være så lav at den hverken er mulig å detektere eller kvantifisere [2]. Dette er typiske utfordringer ved rus- og legemiddelanalyse, som ofte kan løses ved å foreta en prøveopparbeidelse.

LLE, SPE og PP utgjør de vanligste metodene for prøveopparbeidelse. Teknikkene representerer to ulike strategier; de to førstnevnte er ekstraksjonsteknikker (analytt ekstraheres ut av prøven), sistnevnte feller ut forurensninger ved tilsetning av proteinfellingsreagens (analytt beholdes i prøven) [2].

LLE gir mulighet for både opprensing og oppkonsentrering [2]. I denne oppgaven benyttes en ekstraksjonsteknikk som er basert på væskefase-mikroekstraksjon (LPME). LPME er utviklet på grunnlag av tradisjonell LLE. Disse beskrives derfor i avsnitt 2.3.1-3.

2.3.1 Væske-væske-ekstraksjon (LLE)

LLE er basert på fordelingen av organiske stoffer mellom to ikke-blandbare væsker; en vandig og en organisk fase. I rus- og legemiddelanalyser overføres som regel analytt fra en vandig prøveløsning til en væske som ikke er blandbar med vann [2].

Fordelingen mellom fasene beskrives med en fordelingskoeffisient, K_d (**Ligning 1**). Høy K_d angir høy fettløselighet og følgelig høy fordeling over til organisk fase.

Ligning 1 [2]:

$$K_d = \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}}$$

$[A]_{org}$ = konsentrasjon i organisk fase

$[A]_{aq}$ = konsentrasjon i vandig fase

Ved ekstraksjon av nøytrale stoffer vil fordelingskoeffisienten være lik fordelingsforholdet, D (**Ligning 2**). For syrer og baser består konsentrasjonen i vandig fase både av dissosiert og udissoiert form. Ligning 2 gjelder for svake baser og viser at fordelingsforholdet påvirkes av både fordelingskoeffisient, pH i vannfasen og stoffets pK_a -verdi [2].

Ligning 2 [2]:

$$D = \frac{C_{org}}{C_{aq}} = \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq} + [AH]^+_{aq}} = K_d \times \frac{K_a}{[H_3O]^+ + K_a}$$

C_{org} = molar konsentrasjon av base i organisk fase

C_{aq} = molar konsentrasjon av base i vandig fase

K_a = dissosiasjonskonstant for korresponderende syre, AH^+

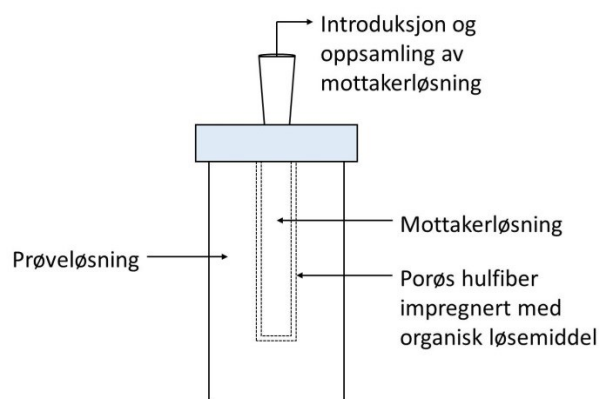
Stort fordelingsforhold gir høyt ekstraksjonsutbytte. Ved ekstraksjon av baser gir lav konsentrasjon av $[H_3O]^+$ større fordelingsforhold og følgelig høyere ekstraksjonsutbytte. Dette kommer av at baser får sin optimale løselighet i organisk fase når pH i vannfasen er minst to enheter høyere enn pK_a -verdien til basen [2]. De fleste legemidler er svake baser, og pH i vannfasen bør derfor justeres slik at stoffene som skal ekstraheres over til organisk fase ikke er ionisert.

Væskeekstraksjon kan utføres med to og tre faser. Med to faser blir analytt ekstrahert fra vandig prøveløsning og over i organisk mottakerfase. Ved analytisk ekstraksjon er volumet av prøveløsning som regel i området 0,5-5 ml. Ekstraksjonen pågår til likevekt er oppnådd. Med tre faser blir analytt ekstrahert fra vandig prøveløsning, over i organisk fase, og deretter tilbakeekstrahert til vandig mottakerfase. Tre faser gir høyere grad av selektivitet fordi

nøytrale forurensninger med høy nok K_d til å ekstrahere over til organisk fase blir gjenværende i organisk fase ved tilbakeekstraksjon til sur vandig fase. Dersom den siste vandige fasen består av et lite volum oppnås også oppkonsentrering [2].

2.3.2 Væskefase-mikroekstraksjon (LPME)

Væskefase-mikroekstraksjon (LPME) utføres med organisk løsemiddel immobilisert i en porøs hulfiber [43]. I publisert litteratur består som regel hulfiberen av polymeren polypropylen, med en tykkelse på 200 μm og en porestørrelse på 0,2 μm [14]. Det organiske løsemidlet må ha lav polaritet og være lite flyktig slik at det ikke fordamper under ekstraksjon. Analyttene må ha høyere løselighet i det organiske løsemidlet enn i prøveløsningen. Løsemidler med lav polaritet holdes på plass inne i hulfiberen av sterke kapillærkrefter [43]. Teknikkens enkle engangsoppsett er vist i **Figur 8**.



Figur 8: Skjematisk fremstilling av engangsoppsettet for LPME, modifisert fra [44]

LPME kan utføres i et tofase- og trefasesystem. Drivkraften er passiv diffusjon mellom de ulike fasene [45]. I tofasesystemet består væskemembran og mottakerløsning av samme organiske løsemiddel [46]. Fordelingen av analytt mellom prøveløsning (donorfase) og mottakerløsning (akseptorfase) beskrives med **Ligning 3**.

Ligning 3 [46]:

$$A_{\text{donorfase}} \leftrightarrow A_{\text{organisk akseptorfase}}$$

I trefasesystemet blir hulfiberen fylt med vandig mottakerløsning. Fordelingen mellom prøveløsning, væskemembran og mottakerløsning beskrives med **Ligning 4**. Vandig ekstrakt kan analyseres direkte med LC.

Ligning 4 [46]: $A_{donorfase} \leftrightarrow A_{organisk\ membran} \leftrightarrow A_{vandig\ akseptorphase}$

Fordelingen mellom fasene beskrives med den allerede presenterte ligningen for fordelingskoeffisienten, K_d (**Ligning 1**). I tofase-LPME er det fordelaktig med høy fordelingskoeffisient. For syrer og baser er det viktig at pH i prøveløsningen justeres på en slik måte at fordelingskoeffisienten blir høyest mulig. I trefase-LPME bør fordelingskoeffisienten være høy nok for overgang til organisk væskemembran, men samtidig lav nok til at analyttene diffunderer videre til vandig mottakerløsning.

Ekstraksjonen i LPME styres av flere parametere; volum av prøve- og mottakerløsning, analyttens fordelingskoeffisient, prøveløsningens viskositet, ristehastigheten og væskemembranens overflateareal [47].

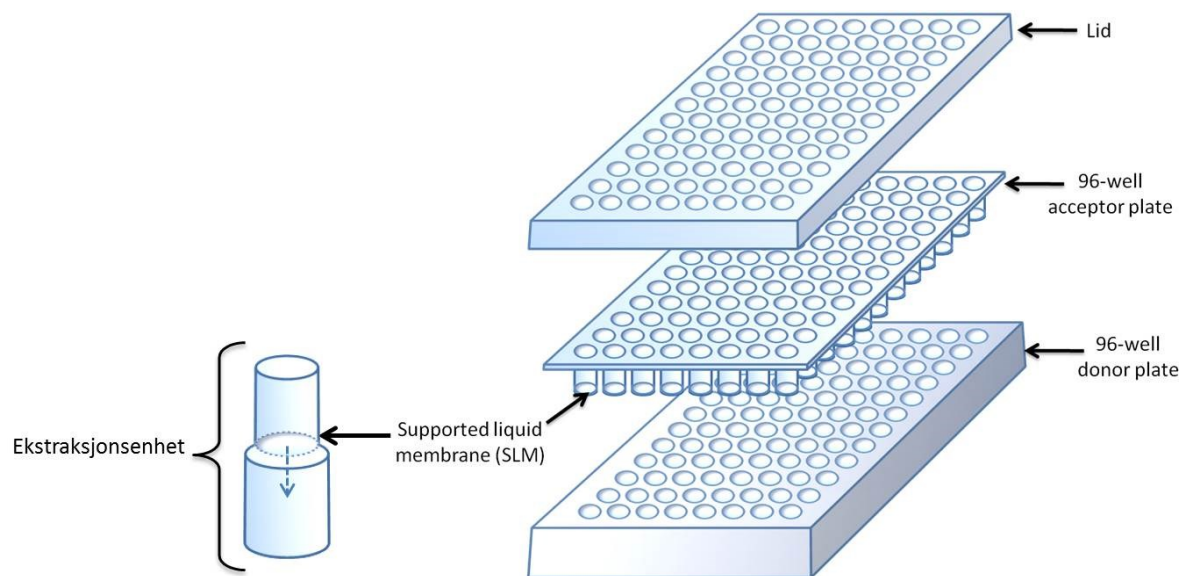
Sammenlignet med tradisjonell LLE gir LPME en rekke fordeler: vandige ekstrakter, mulighet for høy grad av oppkonsentrering [48] og redusert forbruk av organisk løsemiddel. Vandige ekstrakter øker selektiviteten på grunn av ulik pH i prøve- og mottakerløsning, i tillegg til direkte kompatibilitet med LC [43].

2.3.3 Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction (PALME)

PALME er en miniaturisert form for LLE, utført i et 96-brønnsformat med flate membraner (**Figur 9**). Prøve- og mottakerløsning plasseres i henholdsvis bunnplaten (*donor plate*) og mottakerplaten (*acceptor plate*), og holdes adskilt av en kunstig væskemembran (*supported liquid membrane*) [22]. Et topplokk (*lid*) settes på for å hindre fordamping under ekstraksjon.

Den kunstige væskemembranen dannes ved å pipettere et lite volum organisk løsemiddel på filteret i bunnen av mottakerplaten. Idet organisk løsemiddel inkorporeres i filteret sørger kapillærkrefter for at væsken trekker utover og inn i materialet. I foreløpig publisert litteratur består filteret av polymeren polypropylen, tilsvarende hulfiberen i HF-LPME, og det benyttes et væskemembranvolum på 2 μ l. Det organiske løsemidlet som benyttes som væskemembran må være ikke-blandbart med vann for å hindre lekkasje til prøve- og mottakerløsningen [22].

Ekstraksjon over membranen drives av en pH-gradient, og fremmes med en ristehastighet på 900 rpm [22]. Ved ekstraksjon av sure og basiske analytter justeres pH i prøve- og mottakerløsning slik at analyttene er uionisert i prøveløsningen og ionisert i mottakerløsningen. Ionisering i mottakerløsningen hindrer tilbakeekstraksjon til den organiske væskemembranen. I publisert litteratur ekstraheres stoffer fra 250-450 μl prøveløsning til 50-150 μl mottakerløsning [22], noe som gir en oppkonsentrering.



Figur 9: Ekstraksjonsenhet, samt bunnplate (*donor plate*), mottakerplate (*acceptor plate*), organisk væskemembran (*supported liquid membrane*) og topplokk (*lid*) i PALME-oppsettet [22]

Polyvinylidenfluorid (PVDF) versus polypropylen

PALME ble i denne oppgaven utført med kommersielt tilgjengelige mottakerplater med membranfiltre bestående av det porøse materialet polyvinylidenfluorid (PVDF). I den publiserte PALME-artikkelen ble PVDF-filtrene erstattet med selvlagede filtre av polypropylen fordi det ble oppdaget uspesifikk binding til PVDF-materialet [22]. Noen få ekstraksjoner ble utført med PVDF-filtrene før de ble erstattet, men ingen resultater ble publisert. Mottakerplater med filtre av polypropylen er foreløpig ikke kommersielt tilgjengelige.

2.4 Væskekromatografi (LC)

Væskekromatografi separerer stoffer fra hverandre ved at stoffene injiseres i en mobilfase (væske) som frakter stoffene forbi en stasjonærfase (fast). Mobilfasen kan ha lik sammensetning under hele analysen (isokratisk eluering), eller endres underveis (gradienteluering). Stasjonærfasen består av porøse partikler som sitter på innsiden av en kolonne. Stoffer retarderes som følge av interaksjon mellom aktive grupper på overflaten av kolonnepartiklene og stoffene som analyseres. Dette gir opphav til ulik fordeling av stoffene mellom mobil og stasjonær fase. Forskjell i retensjon gir separasjon av stoffene [2]. Ulike separasjonsprinsipper kan benyttes. Separasjonsprinsippet som er benyttet i denne oppgaven er omvendt-fase-kromatografi.

2.4.1 Omvendt-fase-kromatografi

I omvendt-fase-kromatografi er stasjonærfasen hydrofob. Retensjon oppstår følgelig av hydrofobe interaksjoner. Den vanligste og mest brukte stasjonærfasen er oktadecylsilika (C18), som også er benyttet i denne oppgaven. C18 er den mest hydrofobe silikabaserte stasjonærfasen og består av karbonkjeder med 18 karbonatomer [2].

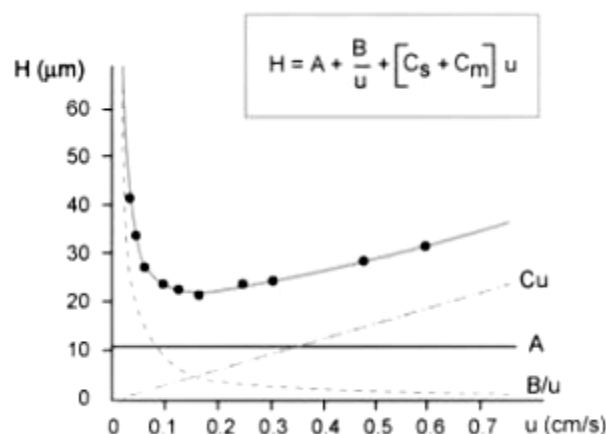
Mobilfasen består av en vandig fase og et organisk løsemiddel. Metanol er som regel førstevalget fordi det har lavere toksisitet enn for eksempel acetonitril. Innhold av organisk løsemiddel bestemmer styrken til mobilfasen. Økende styrke gir avtagende retensjon på grunn av redusert interaksjon mellom analytt og stasjonærfase [2].

Retensjon av nøytrale stoffer styres utelukkende av mengden organisk løsemiddel, og påvirkes ikke av pH. Retensjon av syrer og baser påvirkes imidlertid av både pH og mengde organisk løsemiddel. Endringer i de to parameterne kan benyttes for å oppnå høyere grad av selektivitet [2]. pH i mobilfasen styres ved tilsetning av buffer. Ved endring av pH bør det tas hensyn til analyttens pKa-verdi fordi retensjonen avtar med økende ionisering. Ionisering gir høyere vannløselighet og følgelig lavere retensjon på en omvendt-fase-kolonne. For å oppnå en robust separasjonsmetode er det anbefalt å benytte en pH som enten gir fullstendig ionisering eller fullstendig undertrykkelse. Ved bruk av silikabasert stasjonærfase bør mobilfasens pH ligge innenfor et område på 2-8 fordi høy pH løser opp silikamaterialet og lav pH gir avspalting av de funksjonelle gruppene [2].

2.4.2 Ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)

Tradisjonell væskerkromatografi, *high performance liquid chromatography* (HPLC), har fått en etterkommer: *ultra high performance liquid chromatography* (UHPLC). UHPLC separerer stoffer med samme prinsipp som HPLC. Hovedforskjellen er at det som regel benyttes kortere kolonner med mindre partikkelstørrelse i UHPLC, sammenlignet med HPLC [49].

Den empiriske *van Deemters ligning* (**Figur 10**) har vært sentral i utviklingen av UHPLC. Ligningen beskriver forholdet mellom lineær hastighet av mobilfase og platehøyde (HETP eller H) [50], samt de ulike faktorene som påvirker platehøyden. Faktorene deles inn i eddydiffusjon, longitudinal diffusjon og masseoverføring. Den relative betydningen av hver enkelt faktor påvirkes av mobilfasehastigheten. Partikkelstørrelse og form, sammen med flere andre faktorer, påvirker platehøyden. Med partikkelstørrelse som en av variablene kan van Deemters ligning brukes til utforsking av kromatografisk opptreden, samt optimalisering av mobilfasehastighet [51].



Figur 10: Van Deemters ligning og van Deemters kurve [51]

H = HETP = platehøyde
 A = eddydiffusjon
 B = longitudinal diffusjon
 u = mobilfasehastighet
 C = masseoverføringskoeffisient

Fordi partiklene er runde gir mindre partikkelstørrelse økt total overflate for pakkematerialet, med bedre oppløsning som resultat. Dette kan forklares ut fra effektiviteten, som er proporsjonal med kolonnelengden og invers proporsjonal med partikkelstørrelsen. Kolonnen kan følgelig forkortes med samme faktor som partikkelstørrelsen minskes, uten tap av oppløsning.

Redusert partikkelstørrelse, og dermed flere partikler, gir økt trykk i systemet. Et UHPLC-system er av den grunn mye mer trykkbelastet enn et HPLC-system. Dette medfører et behov for en mobilfasepumpe som leverer løsemidler presist under høyt trykk under elueringen [49].

UHPLC-separasjoner benytter vanligvis pakkematerialer med en partikkelstørrelse på 1,7-1,8 μm . Til sammenligning benyttes partikkelstørrelser på 3,0-5,0 μm i tradisjonell HPLC. Dette stiller krav til detektoren, som må ha høy nok hastighet til å motta datapunkter langs hele toppen for å integrere både nøyaktig og reproduserbart [49].

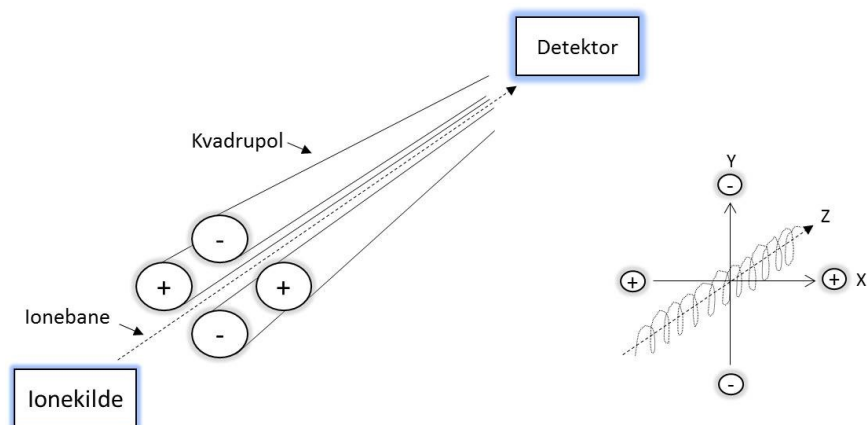
2.5 Massespektrometri (MS)

Massespektrometri (MS) til deteksjon er gullstandard innen rus- og legemiddelanalyse. Et massespektrometer separerer og detekterer stoffer basert på stoffenes forhold mellom masse og ladning (m/z) [2].

Stoffene som skal detekteres må ioniseres før de kan separeres i en masseanalysator. Ioniseringen skjer enten i vakuum inne i selve massespektrometeret, eller rett utenfor ved atmosfærisk trykk. Ulike ioniseringsteknikker kan benyttes, og i denne oppgaven benyttes elektrospayionisering (ESI). Selve ioniseringen skjer da utenfor massespektrometeret [2].

Etter ioniseringen passerer ionene gjennom en trang åpning inn til masseanalysatoren, med påfølgende separasjon under vakuumbetingelser (lavt trykk). Det lave trykket i analysatoren er viktig for å unngå kollisjon mellom ioner og luftmolekyler, og for å medvirke til at ionene når frem til detektoren [2].

Ulike masseanalysatorer kan benyttes til å separere ionene, blant annet kvadrupol, ionefelle og *time of flight* (TOF). Analysatorene separerer ioner med et elektrisk eller et magnetisk felt [52]. Mest brukt er kvadrupolanalysatoren, som består av fire parallelle stenger med et pålagt elektrisk felt (**Figur 11**). Motsatte stenger pålegges en spenning med samme radiofrekvens (RF). Styrken på det elektriske feltet avgjør hvilke ioner som oscillerer stabilt gjennom kvadrupolen (langs z-aksen i **Figur 11**) og registreres av detektoren [2]. Kvadrupolanalysatorer avhenger utelukkende av m/z -forholdet, og ikke den kinetiske energien til ionene. Det betyr at ionekilden kan operere med et lavt potensial, noe som gir kompatibilitet med kromatografisk kobling [52].

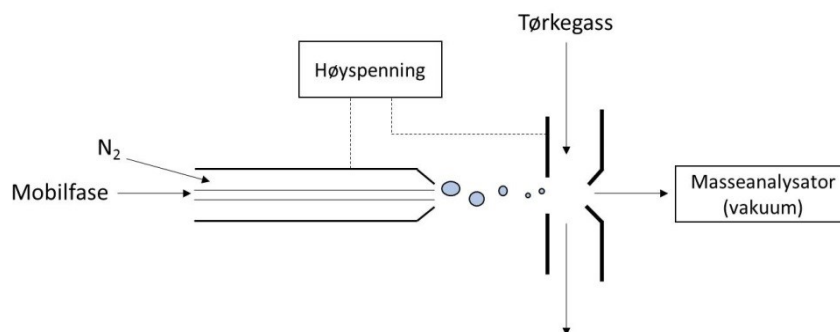


Figur 11: Kvadrupolanalysator, modifisert fra [2] og [52]

Detektoren registrerer mengden ioner og tilhørende masse. Det opereres etter to ulike prinsipper: spekteropptak og selektiv ionemonitorering (SIM). Spekteropptak utføres ved at massespektre tas opp per tidsenhet; masseanalysatoren måler de ulike massene én etter én. SIM utføres ved å måle kontinuerlig på én masse [2]. Resultatet fremstilles i et massespektrum.

2.5.1 Elektrosprayionisering (ESI)

Elektrosprayionisering (ESI) utføres med et sterkt elektrisk felt. Analytt føres inn i massespektrometeret i en mobilfase som fortrinnsvis består av flyktige komponenter, for eksempel ammoniumformat [2]. Væskestrømmen passerer gjennom et trangt kapillærrør. Ved utgangen av kapillæret akkumuleres ladninger på væskeoverflaten som følge av et pålagt potensial (1-6 kV) mellom kapillærrøret og en motelektrode [52]. Potensialet som benyttes avhenger av overflatespenningen til løsemiddelet i mobilfasen. Motkrefter mellom like ladninger gjør at væskedråpen vokser til den sprekker. Det dannes en *aerosol*. Aerosolen består av mange små dråper med elektrisk ladning. Dråpene passerer en inert tørkegass, som regel nitrogen (N_2), som fordamper rester av mobilfasemolekyler og fører disse ut av massespektrometeret. Ved høy nok overflatespenningen starter frigjøringen av ioner fra dråpeoverflaten til de små, elektrisk ladde dråpene. Elektrisk spenning fører ionene videre inn i masseanalysatoren [2]. **Figur 12** viser en skjematisk fremstilling av denne prosessen.



Figur 12: Prinsipp for elektrosprayionisering (ESI), modifisert fra [2]

ESI betegnes som en myk ioniseringsteknikk. Det vil si at det hovedsakelig dannes ufragmenterte molekyllioner [2]. ESI danner positive og negative ioner via de elektrokjemiske reaksjonene oksidering og reduksjon. Reaksjonene avhenger av konsentrasjon, og mengden ioner som detekteres per tidsenhet er følgelig begrenset av reaksjonene [52].

2.5.2 Tandem massespektrometri (MS/MS)

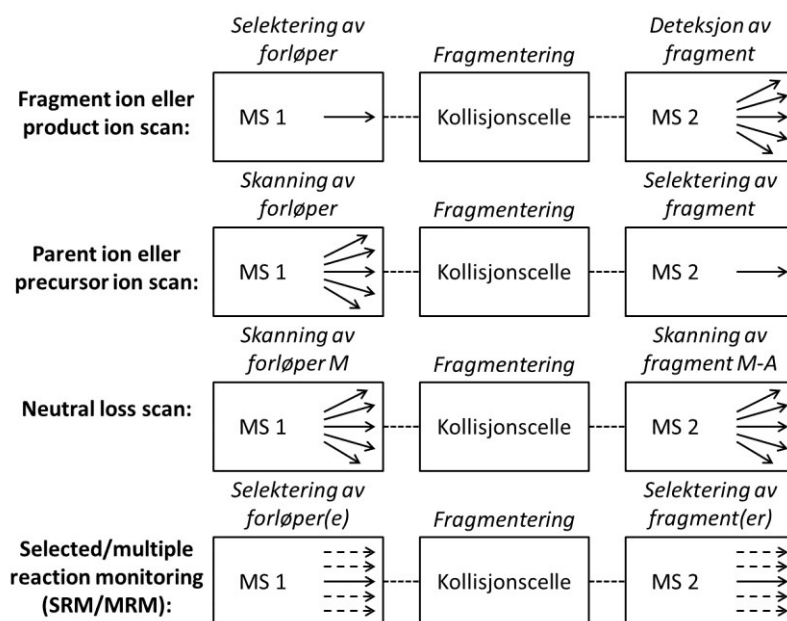
I tandem massespektrometri (MS/MS) benyttes to etterfølgende masseanalysatorer til å separere ionene. I denne oppgaven er MS/MS utført med trippelkvadrupol.

Trippelkvadrupol (QqQ)

En trippelkvadrupol består av tre kvadrupolanalysatorer plassert etter hverandre i et massespektrometer. Første kvadrupol (Q) selekterer ut én eller flere karakteristiske m/z -verdier for stoffet som analyseres. Andre kvadrupol (q) fungerer som en kollisjonscelle, hvor selekterte ioner fra første kvadrupol brytes ned til produktioner, vanligvis ved reaksjon med inerte gasser som nitrogen (N_2) eller argon (Ar), såkalt *collision-induced dissociation* (CID). Denne kvadrupolen opererer i «RF-only»-modus, uten en pålagt totalspenning, og har dermed evnen til å fokusere ionebanen for et gitt m/z -område [52]. Tredje og siste kvadrupol (Q) måler produktionene, som vanligvis er svært spesifikke for stoffet som analyseres [2].

Skanningsmoduser i tandem MS

Ulike skanningsmoduser kan benyttes i tandem MS, som vist i **Figur 13**. *Product ion scan* selekterer ut én m/z i første spektrometer (MS 1) som fragmenteres til produktioner i kollisjonscellen. Produktionene detekteres i siste spektrometer (MS 2). I et *precursor ion scan* er MS 2 innstilt til å detektere en gitt m/z . MS 1 skanner massene til ionene som fragmenteres til den selekterte massen i kollisjonscellen. I *constant neutral loss* skanner MS 1 og MS 2 samtidig. Deteksjon i MS 2 skjer dersom MS 1 har skannet et ion med masse M som gir et fragment med massetap A etter kollisjonscellen [52]. I denne oppgaven benyttes *multiple reaction monitoring* (MRM). I SRM og MRM er både MS 1 og MS 2 fokusert på henholdsvis én eller flere selekterte masser, tilsvarende SIM-modus i standard MS. MRM er en spesifikk deteksjonsmetode med høy sensitivitet og er godt egnet til kvantifisering [2].



Figur 13: Skanningsmoduser i MS/MS, modifisert fra [52]

2.5.3 Væskekromatografi koblet med tandem massespektrometri (LC-MS/MS)

LC-MS/MS er en velegnet og foretrukket metode ved analyse av rus- og legemidler i biologiske prøver på grunn av svært god spesifisitet [3]. Stoffer som analyseres med LC-MS/MS blir først separert i en kromatografisk kolonne, deretter ionisert og så detektert i et massespektrometer [2].

Ulike hensyn må imidlertid tas ved LC-MS-kobling: mobilfasen må bestå av flyktige komponenter, bufferkonsentrasjonen må være så lav som mulig, og ioneparreagenser og surfaktanter må unngås fordi de forstyrrer ioniseringsprosessen og forårsaker ioneundertrykkelse. Ionisering med ESI er ideelt ved LC-MS-kobling fordi ESI krever at analyseprøven er i væskeform, men høy saltkonsentrasjon må unngås [52].

Massespektrometeret fungerer som en avansert detektor under hele separasjonstiden. Ved endt analyse kan et kromatogram plottes med topper for de separerte stoffene, med signal langs y-aksen og retensjonstid langs x-aksen. Signalet er intensiteten til de registrerte ionene summert for hvert massespektrum. Total ionestrøm (TIC fra *total ion current*) plottes fortløpende som funksjon av separasjonstid og gir et totalt ionestrømskromatogram [2].

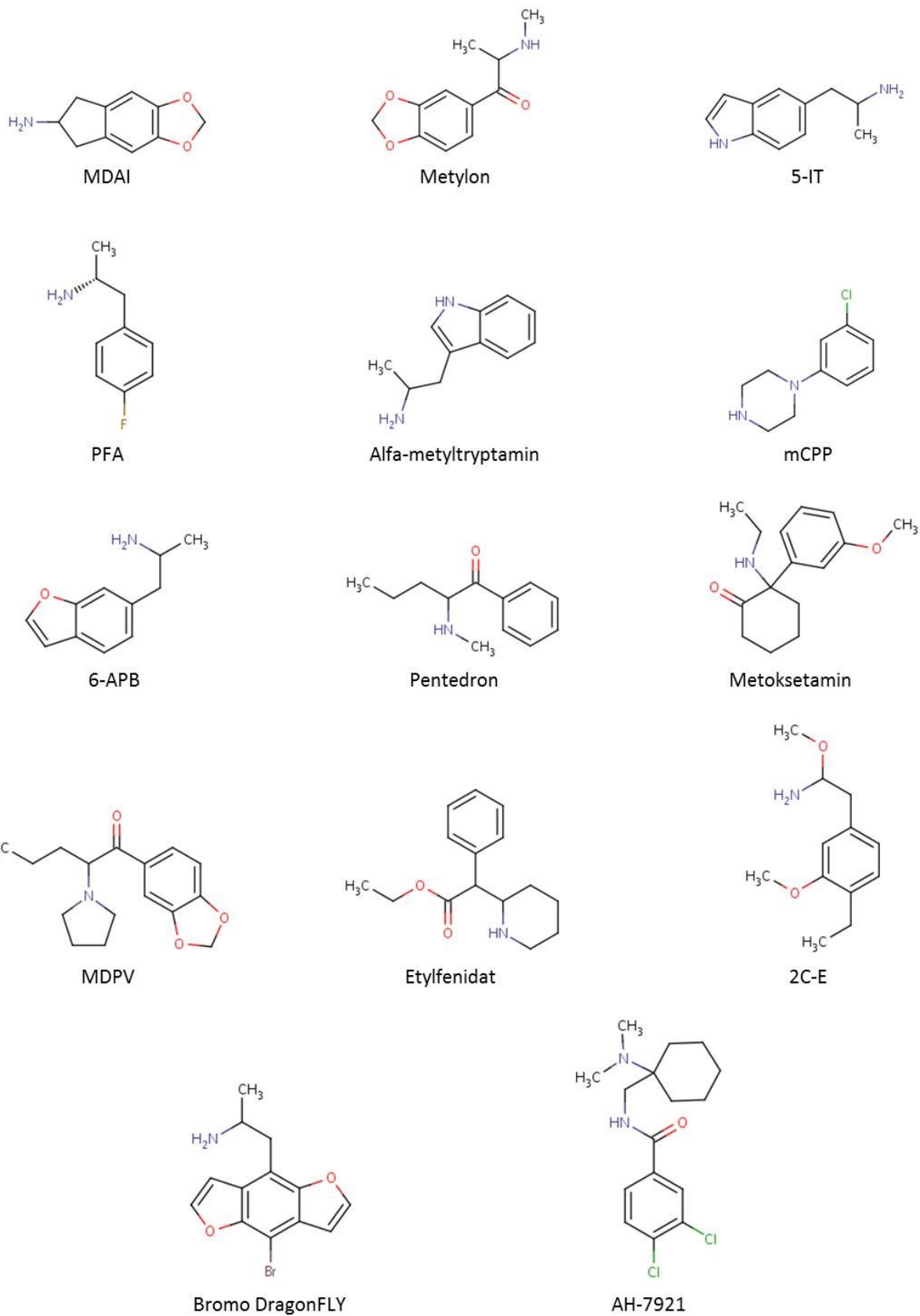
3 Materiale og metode

3.1 Analyttkarakteristikk

Fysikalskjemisk karakteristikk av analyttene er presentert i **Tabell 3.1** og strukturformler er vist i **Figur 14**.

Tabell 3.1: Analyttkarakteristikk [53]

	Molekylformel	pKa	log <i>P</i>	Molekylvekt	Subgruppe NPS
MDAI	C ₁₀ H ₁₁ NO ₂	10,0	1,1	177,2	Fenetylamin
Metylon	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	8,0	1,2	207,2	Syntetisk katinon
5-IT	C ₁₁ H ₁₄ N ₂	10,0	1,9	174,2	Fenetylamin
PFA	C ₉ H ₁₂ FN	10,0	2,0	153,2	Fenetylamin
Alfa-metyltryptamin	C ₁₁ H ₁₄ N ₂	10,0	1,9	174,2	Tryptamin
mCPP	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂	8,9	2,2	196,7	Piperazin
6-APB	C ₁₁ H ₁₃ NO	10,0	2,0	175,2	Fenetylamin
Pentedron	C ₁₂ H ₁₇ NO	8,2	2,6	191,3	Syntetisk katinon
Metoksetamin	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	8,1	2,9	247,3	Arylsykloheksylamin
MDPV	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	7,3	3,0	275,3	Syntetisk katinon
Etylfenidat	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	9,1	2,6	247,3	Fenetylamin
2C-E	C ₁₂ H ₁₉ NO ₂	9,7	2,2	209,3	Fenetylamin
Bromo DragonFLY	C ₁₃ H ₁₂ BrNO ₂	9,8	2,9	294,1	Fenetylamin
AH-7921	C ₁₆ H ₂₂ Cl ₂ N ₂ O	9,5	4,0	329,3	Syntetisk opioid



Figur 14: Analyttenes kjemiske struktur [53]

3.2 Utstyr

Tabell 3.2: PALME-oppsett

	Beskrivelse	Produsent	By / Land
Bunnplate	96 well plates, 0.50 mL, polypropylene 120/pk	Agilent	Santa Clara, CA, USA
Mottakerplate og topplokk	MAIPN4550 96-well MultiScreen-IP Filter Plate with 0.45 µm porous polyvinylidene fluoride (PVDF). Intern diameter = 6.0 mm.	Millipore	Billerica, MA, USA

Tabell 3.3: Analyseinstrument

	Beskrivelse	Produsent	By / Land
Væskeskromatograf	Acquity™ Ultra Performance LC	Waters	Milford, MA, USA
Detektor	Quattro Premier XE	Waters	Milford, MA, USA
Kolonne	HSS T3 1,8 µm 2,1×100 mm	Waters	Milford, MA, USA
Lab-datasystem	MassLynx 4.1	Waters	Milford, MA, USA

Tabell 3.4: Pipetter

	Beskrivelse	Produsent	By / Land
Finnpipette	Biohit	Labsystems	Vantaa, Finland
Multipipette	Eppendorf Multipipette® Xstream	VWR	Radnor, PA, USA
8-kanalpipette	RAININ pipet-lite 100-1200 µl LTS	Mettler Toledo	Küsnacht, Sveits
Pipettespisser til finnpipette	(med og uten filter)	Sartorius	Helsinki, Finland
Pipettespisser til multipipette	Eppendorf	Labsystems	Vantaa, Finland
Pipettespisser til 8-kanalpipette	ART® Molecular Bioproducts	Sigma-Aldrich	Steinheim, Tyskland

Tabell 3.5: Diverse utstyr

	Beskrivelse	Produsent	By / Land
Analysevekt		Mettler Toledo	Küsnacht, Sveits
Ristemaskin	Vibramax 100	Heidolph Instruments	Schwabach, Tyskland
Vortex-maskin	Multitube Vortexer	VWR	Radnor, PA, USA
pH-indikatorpapir		Merck	Darmstadt, Tyskland
Plastvialer	Polypropylen vial with snap cap, 300 µl, PFTE / Siliconsepta	Waters	Milford, MA, USA
Plastrør	(5,0 ml)	Sarstedt	Hildesheim, Tyskland
Glassrør	(5,0 ml)	ApodanNordic	København, Danmark

3.3 Kjemikalier

Tabell 3.6: Referansestoffer

Stoffnavn	Produsent	By / Land	Renhet (%)
MDAI	Beslag fra KRIPOS		Ukjent
Metylon	Beslag fra KRIPOS		Ukjent
5-IT	LGC	Teddington, Storbritannia	99,5 %
PFA	Chiron AS	Trondheim, Norge	98,9 %
Alfa-metyltryptamin	Acros Organics	Geel, Belgia	99,5 %
mCPP	Sigma-Aldrich	Steinheim, Tyskland	100 %
6-APB	Chiron AS	Trondheim, Norge	97 %
Pentedron	Lipomed	Arlesheim, Nederland	99,8 %
Metoksetamin	LGC	Teddington, Storbritannia	98,3 %
MDPV	National Measurement Inc.	Montvale, New Jersey, USA	99 %
2C-E	Beslag fra KRIPOS		Ukjent
Etylfenidat	Cayman Chemical Company	Ann Arbor, Michigan, USA	100 %
Bromo DragonFLY	Chiron AS	Trondheim, Norge	98 %
AH-7921	Cayman Chemical Company	Ann Arbor, Michigan, USA	100 %

Tabell 3.7: Diverse kjemikalier

Navn	Kvalitet	Produsent	By / Land
Natriumhydroksid (NaOH)		Merck Millipore	Darmstadt, Tyskland
Maursyre (HCOOH)		VWR	Radnor, PA, USA
Diheksyleter		Sigma-Aldrich	Steinheim, Tyskland
Trioktylamin		Sigma-Aldrich	Steinheim, Tyskland
Metanol	HPLC	Fisher Scientific	Geel, Belgia
Ammoniumformat		VWR	Radnor, PA, USA
Nonanon		Sigma-Aldrich	Steinheim, Tyskland
Dodecylacetate		Sigma-Aldrich	Steinheim, Tyskland
Isopentylbenzen		Sigma-Aldrich	Steinheim, Tyskland
Nitrofenyloktyleter		Sigma-Aldrich	Steinheim, Tyskland
Heksadekan		Sigma-Aldrich	Steinheim, Tyskland
Acetonitril (ACN)		Lab-Scan	Gliwice, Poland
Ionebyttet vann	Millipak® 0,22 µm filter	Merck Millipore	Darmstadt, Tyskland

3.4 Løsninger

3.4.1 Stamløsninger

Enkeltvis stamløsninger med renstoff av alle analyttene, bortsett fra metoksetamin, var ferdiglagde og tilgjengelige ved FHI. Stoffene var løst i metanol.

10 ml stamløsning av metoksetamin ble laget ved å veie ut 9,69 mg renstoff og fortynne med metanol. Renheten på stoffet var oppgitt til å være 98,3 %, og en stoffmasse på 283,8 g/mol ga en tilsvarende stoffmengde i stamløsningen på 0,034 mmol. Stoffmengde per volum ga en konsentrasjon på 3,356 $\mu\text{mol/ml}$, tilsvarende 3356 μM .

Stamløsningene ble oppbevart ved -20°C .

3.4.2 Arbeidsløsning

En arbeidsløsning med alle stoffene ble laget ved å tilsette stamløsninger av hvert enkelt stoff til en 10 ml målekolbe og fortynne med metanol.

Arbeidsløsningen ble oppbevart ved -20°C .

Arbeidsløsning med like konsentrasjoner

Til de innledende forsøkene ble det laget en 20 μM arbeidsløsning for samtlige stoffer.

Arbeidsløsning med konsentrasjonsinndeling

Til valideringen ble det laget en ny arbeidsløsning basert på erfaringene fra de innledende forsøkene. Enkelte stoffer (**Tabell 3.8**, gruppe I) ga gjentagende høy signalintensitet, selv ved lave konsentrasjoner. Andre stoffer (**Tabell 3.8**, gruppe III) ga høy RSD, selv ved høye konsentrasjoner. Med hensikt å finne optimale betingelser for hvert enkelt stoff ble stoffene delt inn i tre konsentrasjonsgrupper.

I forkant av tillagingen ble det ekstrahert en fortynningsrekke med opprinnelig arbeidsløsning (avsnitt 3.9.5). Laveste konsentrasjonsnivå for hvert enkelt stoff som ga RSD på under 15 % dannet grunnlag for å gruppere stoffene. **Tabell 3.8** gir oversikt over gruppeinndeling og tilhørende konsentrasjon i arbeidsløsningen.

Tabell 3.8: Konsentrasjonsgruppene i den nye arbeidsløsningen

Gruppe I 25,0 µM	Gruppe II 50,0 µM	Gruppe III 500 µM
<ul style="list-style-type: none">• Pentedron• Metoksetamin• Etylfenidat• AH-7921	<ul style="list-style-type: none">• MDAI• Metylon• PFA• mCPP• 6-APB• MDPV• 2C-E• Bromo DragonFLY	<ul style="list-style-type: none">• 5-IT• Alfa-metyltryptamin

3.4.3 Standarder og kontroller

Standarder og kontroller ble laget i 5 ml glassrør ved å fortynne romtemperert arbeidsløsning med Milli-Q-vann til ønsket konsentrasjonsnivå.

Standardene og kontrollene ble oppbevart i kjøleskap ved 4°C.

Konsentrasjoner i blod

Før ekstraksjon ble det tilsatt 50 µl standard eller kontroll til PALME-bunnplaten. Fullblod ble tilsatt i et volum på 100 µl. Ved ekstraksjon av autentiske prøver vil konsentrasjon i blodprøven være halvparten så lav dersom man sammenligner med en standard eller kontroll. Konsentrasjonen i standarder og kontroller er derfor korrigert i forhold til mengde blod slik at konsentrasjonen blir halvparten av verdien i tilsatt vannløsning. **Tabell 3.9** og **3.10** gir en oversikt over hvilke konsentrasjoner i blod de ulike standardene og kontrollene representerer.

Tabell 3.9: Konsentrasjon i blod for standarder brukt til metodevalidering

STANDARDER	Konsentrasjon i blod (µM)					
	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Standard 6
MDAI	0,050	0,35	0,60	0,85	1,1	1,5
Metylon	0,050	0,35	0,60	0,85	1,1	1,5
5-IT	0,50	3,5	6,0	8,5	11	15
PFA	0,050	0,35	0,60	0,85	1,1	1,5
Alfa-metyltryptamin	0,50	3,5	6,0	8,5	11	15
mCPP	0,050	0,35	0,60	0,85	1,1	1,5
6-APB	0,050	0,35	0,60	0,85	1,1	1,5
Pentedron	0,025	0,18	0,30	0,43	0,55	0,75
Metoksetamin	0,025	0,18	0,30	0,43	0,55	0,75
MDPV	0,050	0,35	0,60	0,85	1,1	1,5
Etylfenidat	0,025	0,18	0,30	0,43	0,55	0,75
2C-E	0,050	0,35	0,60	0,85	1,1	1,5
Bromo DragonFLY	0,050	0,35	0,60	0,85	1,1	1,5
AH-7921	0,025	0,18	0,30	0,43	0,55	0,75

Tabell 3.10: Konsentrasjon i blod for kontroller brukt til metodevalidering

KONTROLLER	Konsentrasjon i blod (µM)					
	Kontroll 1	Kontroll 2	Kontroll 3	Kontroll 4	Kontroll 5	Kontroll 6
MDAI	0,050	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
Metylon	0,050	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
5-IT	0,50	2,5	5,0	7,5	10	13
PFA	0,050	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
Alfa-metyltryptamin	0,50	2,5	5,0	7,5	10	13
mCPP	0,050	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
6-APB	0,050	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
Pentedron	0,025	0,13	0,25	0,38	0,50	0,63
Metoksetamin	0,025	0,13	0,25	0,38	0,50	0,63
MDPV	0,050	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
Etylfenidat	0,025	0,13	0,25	0,38	0,50	0,63
2C-E	0,050	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
Bromo DragonFLY	0,050	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
AH-7921	0,025	0,13	0,25	0,38	0,50	0,63

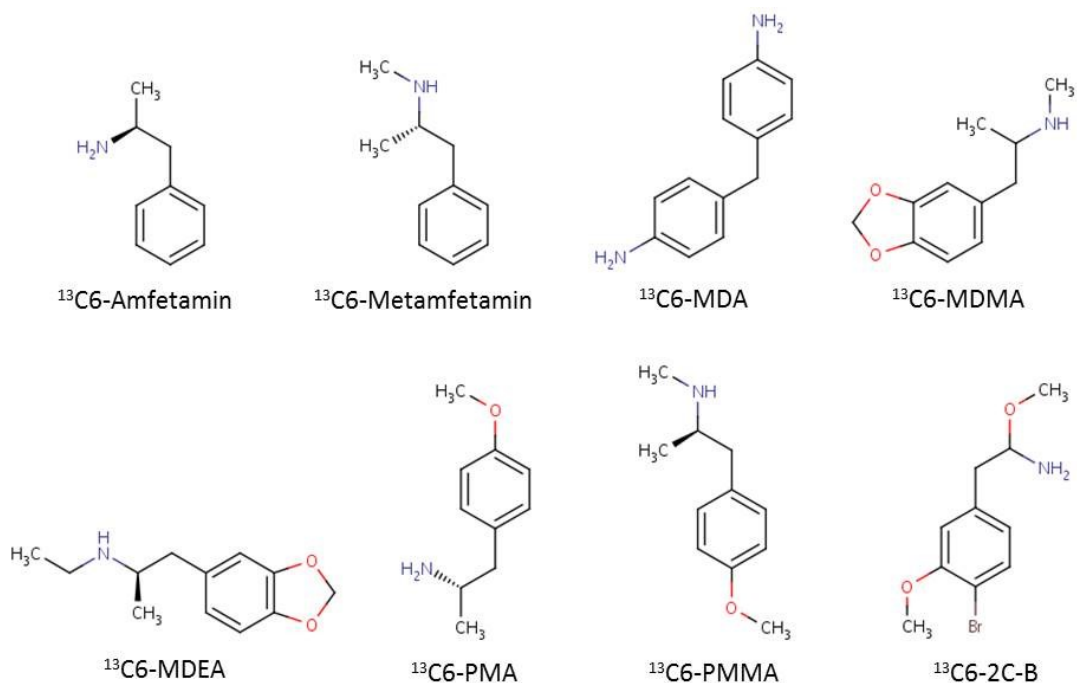
3.4.4 Internstandarder

En 5,0 µM bruksløsning av ^{13}C -merkede stoffer i vann ble benyttet som internstandard (Tabell 3.11). Denne blandingen brukes som internstandard for analyse av amfetaminer i blod ved FHI. Kjemiske strukturer er vist i **Figur 15**.

Bruksløsningen ble oppbevart i kjøleskap ved 4°C.

Tabell 3.11: Internstandarder og tilhørende konsentrasjon i biologiske prøveløsninger

Internstandard	Molekylformel	pKa	log <i>P</i>	Molekylvekt	Konsentrasjon i prøveløsning (µM)
^{13}C -Amfetamin	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}$	10,0	1,8	135,2	0,50
^{13}C -Metamfetamin	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}$	10,2	2,2	149,2	0,50
^{13}C -MDA	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$	10,0	1,4	179,2	0,50
^{13}C -MDMA	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2$	10,1	1,9	193,2	0,50
^{13}C -MDEA	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_2$	10,2	2,2	207,3	0,50
^{13}C -PMA	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}$	10,0	1,7	165,2	0,50
^{13}C -PMMA	$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}$	10,2	2,1	179,3	0,50
^{13}C -2C-B	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{BrNO}_2$	8,5	2,1	260,1	0,50



Figur 15: Kjemisk struktur for internstandarder [53]

3.4.5 Biologiske prøveløsninger

Biologiske prøveløsninger med fullblod som matriks ble komponert direkte i PALME-bunnplaten før ekstraksjon.

FHI får 0-blod fra Blodbanken ved Ullevål sykehus. Blodet ble oppbevart i fryser ved -20°C i brune glassbeholdere og tint før tillaging av biologiske prøveløsninger.

3.5 Autentiske prøver

De autentiske prøvene var en del av rutineprøvene ved FHI og inneholdt noen av testsubstansene. Prøvene har tidligere blitt analysert for vurdering av stoffinntak i obduksjonssaker eller saker med spørsmål om kjøring i påvirket tilstand. Ettersom flere av testsubstansene er forholdsvis nye stoffer var ikke alle tilgjengelige i autentiske prøver. Innhold og tilhørende konsentrasjon i de analyserte prøvene er oppgitt i resultatdelens avsnitt 4.3.

3.6 Instrumentelle betingelser

Analysene ble utført med positiv elektrosprayionisering (ESI) på et UHPLC-MS/MS-instrument (AcquityTM Ultra Performance LC) fra Waters (Milford, MA, USA) med lab-datasystemet MassLynx. Instrumentbetingelsene som ble benyttet i denne oppgaven var tidligere benyttet for lignende stoffer på FHI.

3.6.1 UHPLC-betingelser

Injeksjonsvolum:	3 µl
Injeksjonsmetode:	Pluno (Partial loop with needle overfill)
Weak wash:	600 µl 5 % acetonitril i vann
Strong wash:	200 µl 90 % acetonitril i vann
Kolonnetemperatur:	65°C
Mobilfase:	A: 10 mM ammoniumformatbuffer (pH≈3,1) B: Metanol

«Pluno» er en injeksjonsteknikk der injeksjonsloopen fylles med noe mer prøve enn det som injiseres på kolonnen slik at ikke noe av den injiserte delen av prøven er i kontakt med andre løsninger i injeksjonssystemet. Dette gir vanligvis bedre kromatografi enn «partial loop» injeksjon. Strong wash vasker injeksjonsnålen for tidligere injiserte komponenter og weak wash vasker injeksjonsnålen for sterke løsemidler og frakter prøven gjennom nålen.

10 mM ammoniumformatbuffer (pH≈3,1) ble laget ved å fortynne en 50 mM stamløsning 200:800 ml med Milli-Q-vann. Stam-løsningen var pH-justert til pH=3,1 med konsentrert maursyre, og ble oppbevart i kjøleskap (4°C) på brun flaske.

Mobilfasens gradient er fremstilt i **Tabell 3.12**. Denne ble endret fra en opprinnelig gradient på 16 minutter for å oppnå raskere analyse. Total analysesyklus var på 11 minutter.

Tabell 3.12: Mobilfasens gradient

Tid (min.)	% A	% B	Mobilfasehastighet (ml/min.)
0,00	97,5	2,5	0,50
6,75	65	35	0,50
8,00	35	65	0,50
8,01	0	100	0,50
9,00	0	100	0,50
9,01	97,5	2,5	0,50

Kromatografisk separasjon ble utført med en T3 Acquity UPLC®-kolonne fra Waters, med en indre diameter og lengde på 2,1×100 mm og en partikkelstørrelse på 1,8 µm. Porestørrelsen var 100 Å og overflatearealet 230 m²/g.

3.6.2 MS/MS-betingelser

Kapillærspenning:	1 kV
Ionekildetemperatur:	120°C
Desolvationtemperatur:	450°C
Cone gas flow:	60 liter/time
Desolvation gas flow:	900 liter/time
Multiplikatorspenning:	685 V

Positiv modus (ES+), MRM

Tabell 3.13-3.16 viser MRM-overganger for analytter og internstandarder. Overgangene er delt inn i fire tidsvinduer basert på retensjonstid. Starttid og stopptid for vinduene er omtrentlige fordi væskerkromatografi kan gi opphav til variasjon i retensjonstid, med påfølgende behov for å endre tidsvinduene slik at alle topper blir integrert. Retensjonstid kan også variere med kolonnens alder.

For alle tidsvinduene:	Inter Channel Delay: 0,005 sek.
	Inter Scan Delay: 0,005 sek.

Tabell 3.13: MRM-øverganger (vindu 1)

Vindu 1:	Starttid: ca. 0,6 min. Stopptid: ca. 4,6 min.				
Overgang	Dwell time (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Analytt	Internstandard
142,1 > 97,1	0,010	14	20	¹³ C6-Amfetamin	
142,1 > 125,1	0,010	14	15	¹³ C6-Amfetamin	
154,2 > 109	0,020	10	30	PFA	¹³ C6-PMA
154,2 > 137,2	0,020	10	8,0	PFA	¹³ C6-PMA
156,1 > 97,1	0,010	15	20	¹³ C6-Metamfetamin	
156,1 > 125,1	0,010	15	15	¹³ C6-Metamfetamin	
175,1 > 130	0,020	15	45	5-IT	¹³ C6-MDA
175,1 > 158,1	0,020	15	30	5-IT	¹³ C6-MDA
178,1 > 131	0,050	18	20	MDAI	¹³ C6-PMA
178,1 > 161	0,050	18	12	MDAI	¹³ C6-PMA
186,1 > 141,1	0,017	15	15	¹³ C6-MDA	
186,1 > 169,1	0,017	15	10	¹³ C6-MDA	
200,1 > 139,1	0,010	20	14	¹³ C6-MDMA	
200,1 > 169,1	0,010	20	14	¹³ C6-MDMA	
208,1 > 160	0,020	20	35	Metylon	¹³ C6-PMA
208,1 > 190,1	0,020	20	15	Metylon	¹³ C6-PMA

Tabell 3.14: MRM-øverganger (vindu 2)

Vindu 2:	Starttid: ca. 4,05 min. Stopptid: ca. 5,95 min.				
Overgang	Dwell time (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Analytt	Internstandard
172,1 > 127,1	0,010	15	18	¹³ C6-PMA	
172,1 > 155,1	0,010	15	12	¹³ C6-PMA	
175,1 > 143,1	0,020	16	45	Alfa-metyltryptamin	¹³ C6-PMA
175,1 > 158,1	0,020	15	30	Alfa-metyltryptamin	¹³ C6-PMA
176,1 > 131	0,050	14	20	6-APB	¹³ C6-PMA
176,1 > 159,1	0,050	14	10	6-APB	¹³ C6-PMA
186,2 > 127,1	0,010	15	18	¹³ C6-PMMA	
186,2 > 155,1	0,010	15	12	¹³ C6-PMMA	
197,2 > 119,1	0,010	30	20	mCPP	¹³ C6-PMA
197,2 > 154,1	0,010	30	25	mCPP	¹³ C6-PMA
214,2 > 139,1	0,017	20	14	¹³ C6-MDEA	
214,2 > 169,1	0,017	20	14	¹³ C6-MDEA	

Tabell 3.15: MRM-øverganger (vindu 3)

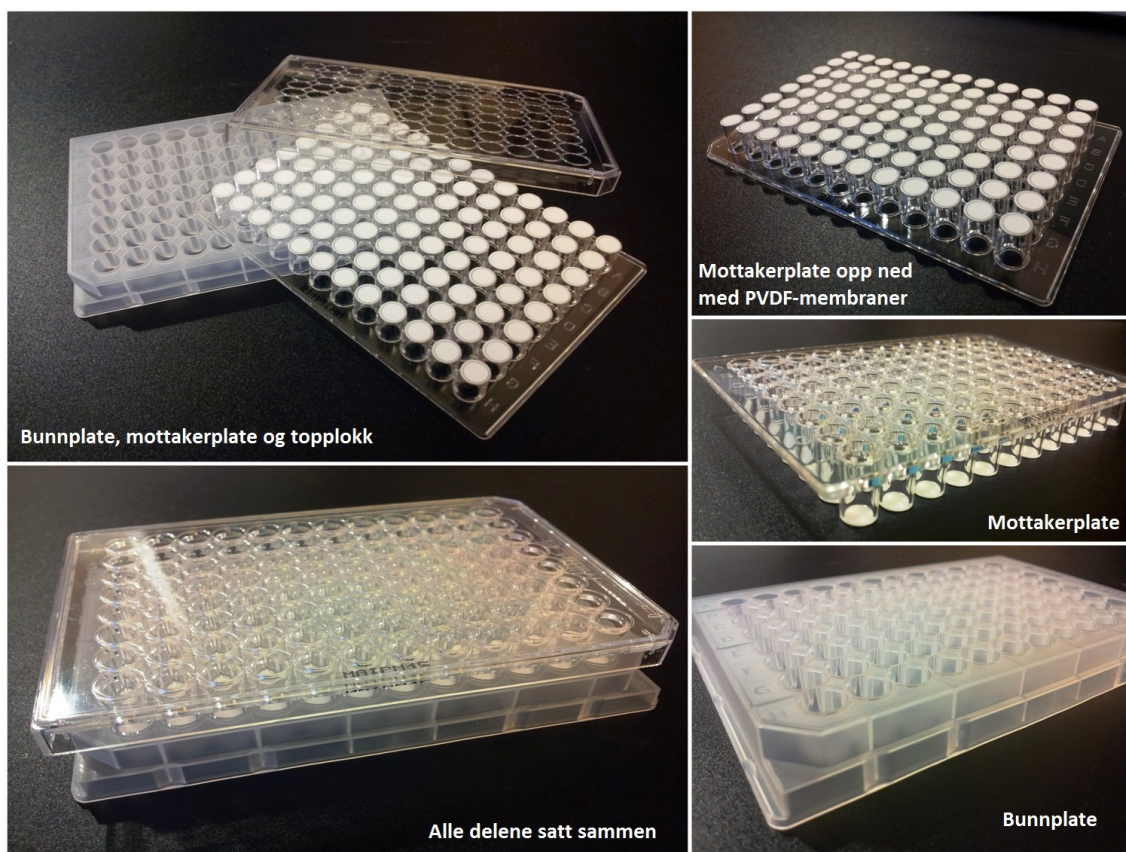
Vindu 3:	Starttid: ca. 5,5 min. Stopptid: ca. 7,8 min.				
Øvergang	Dwell time (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Analytt	Internstandard
192,2 > 132	0,050	18	22	Pentedron	¹³ C6-MDA
192,2 > 174,1	0,050	18	12	Pentedron	¹³ C6-MDA
248,1 > 121	0,020	15	40	Metoksetamin	¹³ C6-PMA
248,1 > 203,1	0,020	15	15	Metoksetamin	¹³ C6-PMA
248,2 > 56	0,050	28	42	Etylfenidat	¹³ C6-PMA
248,2 > 84,1	0,050	28	20	Etylfenidat	¹³ C6-PMA
266,1 > 249	0,017	15	15	¹³ C6-2C-B	
268,1 > 251	0,017	20	15	¹³ C6-2C-B	
276,3 > 126,1	0,020	28	26	MDPV	¹³ C6-MDEA
276,3 > 175,1	0,020	28	20	MDPV	¹³ C6-MDEA

Tabell 3.16: MRM-øverganger (vindu 4)

Vindu 4:	Starttid: ca. 7,5 min. Stopptid: ca. 9 min.				
Øvergang	Dwell time (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Analytt	Internstandard
210,2 > 178,1	0,050	20	18	2C-E	¹³ C6-2C-B
210,2 > 193,1	0,050	20	20	2C-E	¹³ C6-2C-B
294,2 > 141,1	0,020	30	40	Bromo DragonFLY	¹³ C6-MDEA
294,2 > 198,1	0,020	35	30	Bromo DragonFLY	¹³ C6-MDEA
329,2 > 190,1	0,020	28	22	AH-7921	¹³ C6-PMMA
329,2 > 284,2	0,020	28	16	AH-7921	¹³ C6-PMMA

3.7 Utførelse av PALME

Ekstraksjon ble utført med vandige prøveløsninger, tilsatt 0-blod og reelle blodprøver. Fremgangsmåten er beskrevet i avsnitt 3.7.1-3. Oppsettet som ble benyttet er avbildet i **Figur 16**. PALME ble, som nevnt, utført med kommersielt tilgjengelige mottakerplater med membranfiltre bestående av det porøse materialet polyvinylidenfluorid (PVDF).



Figur 16: De ulike delene i PALME-oppsettet

3.7.1 Ekstraksjon fra vandige prøveløsninger

Før ekstraksjon ble 225 μl standard og 25 μl internstandard overført til brønnene i bunnplaten (**Tabell 3.17**). Dette utgjorde en vandig prøveløsning med et totalvolum på 250 μl . Standardene ble laget i 5 ml plastrør ved å fortynne en 20 μM arbeidsløsning med 10 mM NaOH for å gjøre prøveløsningen basisk.

Blindprøver, både med og uten internstandard (henholdsvis 0 og 0+), ble laget med 10 mM NaOH. Prøver med internstandard ble tilsatt 225 μl 10 mM NaOH og 25 μl internstandard. Prøver uten internstandard bestod utelukkende av 250 μl 10 mM NaOH.

Diheksyleter, både med og uten tilsetning av 2 % trioktylamin, ble benyttet som organisk væskemembran. Ulike membranvolum (2,0-3,5 µl) ble avsatt med pipette på PVDF-filteret, med mottakerplaten vendt opp ned. Membranene lufttørket i cirka ett minutt før mottakerplaten ble snudd riktig vei og fylt med 50 µl mottakerløsning bestående av 20 mM HCOOH. Samme mottakerløsning er benyttet i publisert litteratur på grunn av tidligere erfaringer fra HF-LPME og kompatibilitet med LC-MS/MS [22]. Volumforholdet mellom prøve- og mottakerløsning ga mulighet for fem ganger oppkonsentrering ved 100 % ekstraksjonsutbytte.

Før ekstraksjon ble bunn- og mottakerplate kneppet sammen, og et topplokk satt på for å hindre fordamping av mottakerløsningen. Det ferdige oppsettet ble festet til ristmaskinen som fremmet ekstraksjonen med en ristehastighet på 900 rpm [22]. Ekstraksjonstiden varierte fra 15 til 45 minutter.

Ved endt ekstraksjon ble ekstraktene umiddelbart overført fra mottakerplaten til plastvialer for å stoppe en eventuell videre ekstraksjon. Det ble brukt et innstilt pipettevolum på 50 µl for å overføre så mye mottakerløsning som mulig.

Tabell 3.17: Ulike ekstraksjonsbetingelser benyttet ved ekstraksjon fra vandige prøveløsninger

Prøveløsning:	<ul style="list-style-type: none"> • 225 µl standard • 25 µl internstandard 	Volum: 250 µl
Organisk væskemembran:	<ul style="list-style-type: none"> • Diheksyleter [22] • Diheksyleter + 2 % trioktylamin 	Volum: <ul style="list-style-type: none"> • 2,0 µl [22] • 2,5 µl • 3,0 µl • 3,5 µl
Mottakerløsning:	20 mM HCOOH [22]	Volum: 50 µl [22]
Ekstraksjonstid:	<ul style="list-style-type: none"> • 15 min. • 20 min. • 30 min. 	Hastighet: 900 rpm [22]

3.7.2 Ekstraksjon fra tilsatt 0-blod (biologiske prøveløsninger)

Første ekstraksjon fra fullblod ble utført med standarder fortynnet direkte i 0-blod. Det ble tilsatt 50:50 blodstandard og 10 mM NaOH til bunnplaten, og til sist 25 µl internstandard til et totalvolum på 250 µl. Betingelsene ble imidlertid raskt endret og er av den grunn ikke inkludert i **Tabell 3.18**.

Standardene ble heretter fortynnet med Milli-Q-vann, og ikke 10 mM NaOH.

Før ekstraksjon ble det pipettert 100 µl romtemperert fullblod til brønnene i bunnplaten. Deretter ble det tilsatt 75 µl NaOH med konsentrasjon varierende fra 10,0-100 mM, 50 µl vandig standard eller kontroll, og til sist 25 µl internstandard.

Blindprøver, både med og uten internstandard (0 og 0+), ble laget ved å først tilsette 100 µl fullblod og 75 µl NaOH med anvendte konsentrasjon til bunnplaten. Prøver uten internstandard ble videre tilsatt 75 µl vann, og prøver med internstandard ble tilsatt 50 µl vann og 25 µl internstandard.

Organisk væskemembran ble dannet på samme måte som ved ekstraksjon fra vandige prøveløsninger, men med seks ulike organiske løsemidler, oppsummert i **Tabell 3.18**. Mottakerløsning, 20 mM HCOOH, ble tilsatt i et volum på både 50 og 250 µl.

Ekstraksjonen ble i likhet med vandige prøveløsninger utført med en ristehastighet på 900 rpm, men med varighet mellom 20 og 45 minutter.

Tabell 3.18: Ulike ekstraksjonsbetingelser benyttet ved ekstraksjon fra tilsatt 0-blod (biologiske prøveløsninger)

Prøveløsning:	<ul style="list-style-type: none">• 100 µl 0-blod• 75 µl NaOH (20-100 mM)• 50 µl standard / kontroll• 25 µl internstandard	Volum: 250 µl
Organisk væskemembran:	<ul style="list-style-type: none">• Diheksyleter [22]• Dodecylacetat• Nitrofenyloktyleter• Isopentylbenzen• Heksadekan• Nonanon	Volum: 3 µl
Mottakerløsning:	20 mM HCOOH [22]	Volum: <ul style="list-style-type: none">• 50 µl [22]• 250 µl
Ekstraksjonstid:	<ul style="list-style-type: none">• 20 min.• 30 min.• 40 min.• 45 min.	Hastighet: 900 rpm [22]

3.7.3 Ekstraksjon fra autentiske prøver

Ekstraksjon fra autentiske prøver ble utført slik metoden ville blitt utført i en reell setting. Forskjellen fra tilsatt 0-blod var at 50 µl standard eller kontroll ble erstattet med 50 µl vann, og 100 µl reell blodprøve ble tilsatt i stedet for 100 µl 0-blod. Ekstraksjon fra autentiske prøver ble utført med endelige ekstraksjonsbetingelser (**Tabell 3.19**).

Tabell 3.19: Endelige ekstraksjonsbetingelser benyttet til ekstraksjon av autentiske prøver

Prøveløsning:	<ul style="list-style-type: none">• 100 µl blodprøve• 75 µl 80 mM NaOH• 50 µl vann• 25 µl internstandard	Volum: 250 µl
Organisk væskemembran:	Dodecylacetat	Volum: 3 µl
Mottakerløsning:	20 mM HCOOH	Volum: 250 µl
Ekstraksjonstid:	40 min.	Hastighet: 900 rpm

3.8 Forsøksoppsett ved optimalisering av ekstraksjonsparametere

3.8.1 Linearitet og ekstraksjonsutbytte fra vandige prøveløsninger

Det ble ekstrahert fire paralleller av en vandig standardrekke bestående av seks standarder i et konsentrasjonsområde tilsvarende 0,23-4,5 μM i blod.

To ulike væskemembraner ble testet og sammenlignet med hensyn på utbytte og linearitet:

Membran 1 = diheksyleter

Membran 2 = diheksyleter tilsatt 2 % trioktylamin

Ved endt analyse ble det satt opp standardkurver som var beregnet både med og uten internstandard. Kurvene uten internstandard ble manuelt beregnet ved å plotte oppnådd topphøyde mot teoretisk konsentrasjonen i standardene. Kurvene med internstandard ble beregnet ved å plotte forholdet mellom topphøyde for analytt og topphøyde for internstandard mot teoretisk konsentrasjon i standardene.

Standardkurvene som ble beregnet med internstandard dannet grunnlag for valg av internstandard. For samtlige stoffer ble det satt opp kurver regnet mot de åtte ulike internstandardene presentert i avsnitt 3.4.4. Det ble vurdert hvilken internstandard som ga kurve med høyest korrelasjonskoeffisient (r^2). Aktuell internstandard ble valgt som internstandard for aktuelt stoff.

Utgangsløsninger og beregning av ekstraksjonsutbytte

For å beregne ekstraksjonsutbytte ble såkalte utgangsløsninger tilsvarende 100 % ekstraksjonsutbytte for standardene analysert. Utgangsløsningene ble laget ved å fortynne romtemperert arbeidsløsning (20 μM) direkte med mottakerløsning (20 mM HCOOH). Det ble analysert fire paralleller av seks konsentrasjonsnivå i et område tilsvarende 0,23-4,5 μM i blod. Ekstraksjonsutbyttet for standardene ble beregnet som prosentandel av oppnådd signalintensitet for respektiv utgangsløsning.

3.8.2 Organisk væskemembran

Volum (optimalisert med vandig prøveløsning)

Tre paralleller av en vandig prøveløsning med en konsentrasjon tilsvarende $0,9 \mu\text{M}$ i blod ble ekstrahert med fire ulike volum av organisk væskemembran. Dette ble utført med tre ulike ekstraksjonstider, som vist i **Tabell 3.20**, for å undersøke hvilken eventuell betydning forlenget ekstraksjonstid hadde for ekstraksjonsutbyttet.

Tabell 3.20: Testing av fire ulike volum og tre ulike ristetider

	Ekstraksjonstid (min.):											
	15	20	30	15	20	30	15	20	30	15	20	30
Volum:	2,0 μl			2,5 μl			3,0 μl			3,5 μl		

Membran 1 og 2 ble testet også i dette forsøket fordi det var ønskelig å undersøke hvilken betydning tilsetning av trioktylamin hadde for ekstraksjonsutbyttet dersom membranvolumet ble endret.

Valg av organisk løsemiddel (optimalisert med biologisk prøveløsning)

Seks organiske løsemidler ble testet som organisk væskemembran ved ekstraksjon fra en biologisk prøveløsning tilsvarende $1,0 \mu\text{M}$ i blod:

- | | | |
|------------------|------------------------|---------------|
| 1. Diheksyleter | 3. Nitrofenyloktyleter | 5. Heksadekan |
| 2. Dodecylacetat | 4. Isopentylbenzen | 6. Nonanon |

Løsemidlene ble sammenlignet med tanke på ekstraksjonsutbytte og RSD for oppnådd signalintensitet. Signalintensiteten ble målt i form av topphøyde og RSD for oppnådd signalintensitet viste spredningen i oppnådd topphøyde for det antallet paralleller som ble analysert.

3.8.3 Ekstraksjonstid

Optimalisert ekstraksjonstid ble bestemt ved å sammenligne oppnådd ekstraksjonsutbytte og RSD for signalintensiteten etter ekstraksjonstider på 20, 30 og 40 minutter for en biologisk prøve. Det ble ekstrahert fire paralleller av en konsentrasjon tilsvarende 2,0 μM i blod per ekstraksjonstid.

3.8.4 Basetilsetning (pH i prøveløsningen)

Før ekstraksjon ble prøveløsningen gjort basisk ved tilsetning av 75 μl NaOH. Ulike konsentrasjoner NaOH ble undersøkt i to såkalte baseforsøk. Det ble ekstrahert fire paralleller av en standard tilsvarende 1,0 μM i blod. Følgende konsentrasjoner av NaOH ble testet:

Baseforsøk 1: 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 60 mM

Baseforsøk 2: 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM

Konsentrasjonene tilsvarte en sluttkonsentrasjon av NaOH i prøveløsningen på 3,0-30 μM . Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte og RSD for signalintensiteten ble sammenlignet for de ulike konsentrasjonene.

pH ble undersøkt i en biologisk prøveløsning, mottakerløsning og et ekstrakt. Det ble brukt pH-indikatorpapir som viste heltallsverdier opp til pH=10.

3.8.5 Volum av mottakerløsning ved bruk av multikanalpipette

Fordi det var ønsket å teste muligheten for overføring av ekstrakter til en ny bunnplate som plasseres direkte i analyseinstrumentet ble det testet overføring av ulike volum fra brønnene i mottakerplaten til en ny bunnplate med en 8-kanalpipette. Det ble brukt 3 μl dodecylacetat som væskemembran og vann som såkalt mottakerløsning.

Brønnene i mottakerplaten ble fylt med 150, 200 og 250 μl vann. Volum på 100, 150, 200 og 220 μl ble overført til en ny bunnplate med 8-kanalpipetten.

3.8.6 Testing av overdrag mellom brønnene under ekstraksjon

På grunn av observert signal i kromatogrammet for blindprøvene etter en av ekstraksjonene ble det laget et forsøksoppsett for å undersøke om overdrag (*carry-over*) mellom brønnene faktisk forekom, eller om observasjonen var et engangstilfelle. **Figur 17** viser en skjematisk fremstilling av hvordan en hel PALME-bunnplate ble tilsatt blindprøver og systematisk plasserte prøver tilsatt internstandard.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				x				x				x
B		x				x				x		
C				x				x				x
D		x				x				x		
E				x				x				x
F		x				x				x		
G				x				x				x
H		x				x				x		

<div></div>	= 250 µl blindprøve	<div></div>	= 225 µl blindprøve
<div>x</div>	= 250 µl blindprøve + IS	<div>x</div>	= 225 µl blindprøve + IS

Figur 17: PALME-plate med systematisk plasserte blindprøver og prøver inneholdende internstandard

To ulike prøvevolum (250 og 225 µl) ble testet på hver sin halvdel av platen for å undersøke om et redusert prøvevolum ville bidra til redusert overdrag. Under ekstraksjon ble topplokket teipet fast til bunnplaten for å eliminere muligheten for overdrag på grunn av for løst PALME-oppsett. Dette ble heretter gjort til fast prosedyre for å sikre like betingelser for ekstraksjonen.

3.9 Validering av metoden

Følgende parametere ble inkludert i metodevalideringen: identifikasjon, linearitet, presisjon og nøyaktighet, minste detekterbare og kvantifiserbare konsentrasjon (MDK og MKK), retensjonstidsstabilitet for internstandarder, ekstraksjonsutbytte, matrikseffekter, spesifisitet, overdrag og holdbarhet.

Valideringen ble utført med biologiske prøveløsninger (tilsatt 0-blod), og standardene og kontrollene tilsvarte standardene og kontrollene presentert i avsnitt 3.4.3.

3.9.1 Metodedokumentasjon

Det ble utarbeidet en valideringsplan i form av en excel-oversikt med forsøksoppsett for oppgaven. Valideringsplanen ble laget i henhold til retningslinjene i Kvalitetshåndbokens bilag 10.1. Kvalitetshåndboken gjelder for FHI, divisjon for rettsmedisinske fag, og disse retningslinjene stemmer overens med Peters *et al.* [54] og med validering av bioanalytiske metoder gitt av Food and Drug Administration (FDA), USA [55].

3.9.2 Identifikasjon

Stoffene ble identifisert ut fra retensjonstiden til respektive overganger (**Tabell 3.14-3.16**).

3.9.3 Linearitet

Det ble ekstrahert seks paralleller av elleve konsentrasjonsnivå tilsvarende konsentrasjonen i Standard 1-6 og Kontroll 2-6 i avsnitt 3.4.3. Vektete lineære standardkurver ($1/x$) regnet med internstandarders relative respons ble estimert av MassLynx. Kurvenes r^2 ble vurdert. Kurvene dekket et område fra stoffenes kvantifiseringsgrenser til Standard 6.

3.9.4 Presisjon og nøyaktighet

Presisjon innen serie (repeterbarhet) og presisjon mellom serie (reproduserbarhet) ble bestemt på fem konsentrasjonsnivå (Kontroll 2-6). Repeterbarheten ble beregnet med et større antall paralleller av hvert konsentrasjonsnivå enn for reproduserbarheten [54]. For repeterbarhet ble det utført analyse av 10 paralleller for hvert konsentrasjonsnivå i samme serie. For reproduserbarhet ble det utført analyse av to paralleller over syv serier (syv forskjellige

dager). Nøyaktighet ble bestemt samtidig med repeterbarheten og reproduserbarheten, angitt som prosentavvik fra teoretisk verdi.

3.9.5 Minste detekterbare konsentrasjon (MDK)

Minste detekterbare konsentrasjon (MDK) tilsvarer deteksjonsgrensen (LOD fra *limit of detection*).

MDK ble undersøkt ved å ekstrahere en fortynningsrekke hvor laveste standard (0,25 µM) fra de innledende forsøkene ble fortynnet ned til 1/100. Det ble ekstrahert tre paralleller av seks standarder i et konsentrasjonsområde tilsvarende 0,0025-0,050 µM i blod. MDK ble definert som en konsentrasjon som ga et kromatografisk signal (S) som var minst tre ganger høyere enn støynivået (N).

To ulike volum ble testet som mottakerløsning (50 og 250 µl) for å vurdere hvorvidt analyttene var avhengig av oppkonsentrering, eller om ekstraksjon med 250 µl (og ingen oppkonsentrering) ga like gode resultater. Hensikten med å bruke 250 µl som mottakervolum var å tilrettelegge for bruk av multikanalpipette (avsnitt 4.1.5).

3.9.6 Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK)

Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK) tilsvarer kvantifiseringsgrensen (LOQ fra *limit of quantification*).

MKK ble bestemt i henhold til grensene for presisjon og nøyaktighet på $\pm 20\%$ med reproduserbarheten som grunnlag for konklusjon. S/N-forholdet ble beregnet av MassLynx med en minimumsgrense på 10.

3.9.7 Retensjonstidsstabilitet for internstandarder

Retensjonstidsstabiliteten ble bestemt ved å beregne RSD for gjennomsnittlig retensjonstid for internstandarder fra seks ulike serier.

3.9.8 Ekstraksjonsutbytte

Ekstraksjonsutbyttet ble beregnet i henhold til Matuszewskis metode [3]. Signalintensitet for 10 paralleller av prøve tilsatt analytt *før* ekstraksjon ble sammenlignet med tre paralleller av blindprøve tilsatt analytt *etter* ekstraksjon (utgangsløsninger). Ekstraksjonsutbyttet ble undersøkt på tre konsentrasjonsnivå (Kontroll 3, 4 og 5) for å avdekke et eventuelt konsentrasjonsavhengig ekstraksjonsutbytte. Kontroll 3 og 5 representerer et lavere og høyere konsentrasjonsnivå innenfor det lineære området for samtlige stoffer.

Ekstraksjonsutbyttet ble beregnet som prosentvis analyttrespons i forhold til respons fra respektiv standardløsning (utgangsløsning) inneholdende analyttkonsentrasjon tilsvarende 100 % ekstraksjonsutbytte [54].

Utgangsløsninger

I de innledende forsøkene ble ekstraksjonsutbyttet beregnet med utgangsløsninger fortynnet direkte med mottakerløsning (20 mM HCOOH). I dette forsøket ble det komponert mer reelle og sammenlignbare utgangsløsninger ved å tilsette analytt til ekstrakter fra blindprøver i en konsentrasjon tilsvarende 100 % ekstraksjonsutbytte. Dette ble gjort for å oppnå så lik sammensetning som mulig i ekstrakt og utgangsløsning.

Ekstraktene inneholdt hovedsakelig analytt og mottakerløsning. Utgangsløsninger ble derfor laget ved å tilsette standarder fortynnet med 20 mM HCOOH (HCOOH-standard), i stedet for vann, til en konsentrasjon tilsvarende 100 % ekstraksjonsutbytte etter tilsetning til ekstrahert blindprøve. Internstandard ble tilsatt til både ekstrakter og utgangsløsninger etter ekstraksjon.

3.9.9 Matrikseffekter

I denne oppgaven ble Matuszewskis metode benyttet for å undersøke matrikseffekter [3]. Forsøket ble utført ved analyse av **A**: fire paralleller av kontroll tilsatt mottakerløsning (kalt renstoffstandarder) og **B**: kontroll tilsatt ekstraktene fra blindprøver laget av seks ulike blodpartier. Dette ble utført på to konsentrasjonsnivå (Kontroll 3 og 5). Konsentrasjonene representerte et lavere og høyere nivå innenfor lineært område for samtlige stoffer. Ved endt analyse ble absolutte matrikseffekter (ME) beregnet med ligningen $ME = B/A \times 100 \%$. Relative matrikseffekter ble beregnet ved å sammenligne ME for de ulike blodpartiene, oppgitt som RSD.

B: Kontroll tilsatt ekstrakt fra blindprøve ble laget ved å tilsette kontroll og internstandard til ekstraktet fra seks blindprøver. Blindprøvene ble opparbeidet med seks ulike partier av 0-blod, med lik sammensetning som blindprøvene i de andre forsøkene. Kontrollene ble i likhet med standardene i utbytteforsøket fortynnet med 20 mM HCOOH (HCOOH-kontroller), denne gang med hensikt å oppnå høy andel av matriks. For å oppnå dette ble 10 µl HCOOH-kontroll tilsatt 200 µl ekstrakt fra blindprøve til et totalvolum på 220 µl etter tilsetning av 10 µl internstandard. 200 µl ble overført til vialer og analysert. For å sikre samme konsentrasjon i denne løsningen som i 50 µl kontroll tilsatt et totalt prøvevolum på 250 µl (som i de andre forsøkene) ble det først beregnet hvilken sluttkonsentrasjon dette gir. Ut fra dette ble det beregnet hvilken startkonsentrasjon HCOOH-kontrollene måtte ha for å oppnå ønsket sluttkonsentrasjon etter tilsetning av 10 µl til ekstraktene.

A: Renstoffstandardene ble laget ved å tilsette 10 µl HCOOH-kontroll og 10 µl internstandard direkte til 200 µl mottakerløsning (20 mM HCOOH). 200 µl ble overført til vialer og analysert.

3.9.10 Spesifisitet

Stoffer som kan tenkes å interferere eller gi falske positive resultater ble undersøkt ved å analysere standarder fra et utvalg metoder som brukes internt ved FHI. Standardene inneholdt stoffer fra stoffgrupper som særlig amfetaminer (nye psykoaktive stoffer av amfetamintypen), SPICE (syntetiske cannabinoide), vanlige rusmidler/rusgivende legemidler (opioider, amfetaminer, benzodiazepiner osv.) og stoffer brukt til behandling av depresjon, epilepsi og ADHD.

Det ble ekstrahert to paralleller av hver standard, én med og én uten internstandard for å kunne observere eventuelle toppe med samme retensjonstid som internstandard, uten interferens fra denne. Et falskt positivt signal ble definert som en kromatografisk topp med samme retensjonstid og lik eller høyere signalintensitet som laveste standard.

Tabell 3.21 gir en oversikt over renstoffene som ble inkludert i forsøket. Enkelte standarder måtte fortynnes på grunn av høyt metanolinnhold. Dette førte til uønsket lav sluttkonsentrasjon ($\leq 0,0050 \mu\text{M}$), og ingen falske positive signal kunne like gjerne skyldes fortynningen. Stoffene er likevel inkludert i tabellen fordi de er relevante for metodens spesifisitet, og kan eventuelt undersøkes med høyere konsentrasjon på et senere tidspunkt.

Tabell 3.21: Renstoffer i spesifisitetstforsøket og tilsvarende konsentrasjon i blod

Analytt	Konsentrasjon i blod (µM)	Analytt	Konsentrasjon i blod (µM)
Citalopram	1,0	JWH-018	0,00010
Mirtazepin	1,0	JWH-073	0,00010
Venlafaxin	1,0	JWH-081	0,00010
Paroxetin	1,0	JWH-122	0,00010
Sertralin	1,0	JWH-200	0,00010
Fluoxetin	1,0	JWH-210	0,00010
Fluvoxamin	1,0	JWH-250	0,00010
Moklobemid	1,0	AM-2201	0,00010
Reboxetin	1,0	RCS-4	0,00010
Duloxetin	5,0	JWH-019	0,00010
Mianserin	1,0	JWH-015	0,00010
Nortriptylin	1,0	JWH-020	0,00010
Amitriptylin	1,0	JWH-251	0,00010
Trimipramin	1,0	WIN55,212-2	0,00010
Klomipramin	1,0	AM-694	0,00010
Doxepin	1,0	RCS-8	0,00010
Hydroksybupropion	1,0	RCS-4-C4	0,00010
Vareniklin	1,0	JWH-203	0,00010
Haloperidol	0,20	URB-754	0,00010
Proklorperazin	0,50	MAM-2201	0,00010
Aripiprazol	0,50	UR-144	0,00010
Ziprasidon	0,50	AM-2233	0,00010
Levomepromazin	1,0	XLR-11	0,00010
Quetiapin	1,0	HU-210	0,0020
Klozapin	2,0	Levetiracetam	50
Amisulprid	2,0	Gabapentin	100
Perfenazin	0,20	Pregabalin	50
Flupentixol	0,40	Fenobarbital	100
Zuklopentixol	0,50	Lamotrigin	10
Risperidon	0,50	10-OH-karbazepin	50
9-OH-risperidon	0,50	Topiramat	100
Olanzapin	0,50	Fenytoin	100
Klorprotixen	1,0	Karbamazepin-10,11-epoksid	25
Prometazin	2,0	Okskarbazepin	25
Ketobemidon	0,50	Karbamazepin	50
Dextropropoksyfen	20	Alprazolam	0,20
O-desmetyltramadol	20	Flunitrazepam	0,040
Petidin	40	Klonazepam	0,090
Deksklorfeniramin	0,50	Nitrazepam	0,40
Alimemazin	0,50	Fenazepam	0,080
Norpropoxyfen	5,0	Bromazepam	0,40
Hydroksyzin	2,0	Lorazepam	0,20
Lamotrigin	10	Buprenorfin	0,020
Karbamazepin	50	Diazepam	1,3

Analytt	Konsentrasjon i blod (µM)
10-OH-karbazepin	50
Gabapentin	100
Fenytoin	100
Paracetamol	250
Fenazon	50
Salicylsyre	500
Teofyllin	250
Klometiazol	10
Biperidin	2,0
Baklofen	5,0
Verapamil	1,0
Diltiazem	1,0
Karvedilol	1,0
Sotalol	5,0
Metoprolol	5,0
Propranolol	5,0
7-aminoflunitrazepam	0,20
7-aminonitrazepam	0,50
7-aminoklonazepam	1,0
3-MMC	0,0050
1-benzylpiperazin	0,0050
1-fenyletylamin	0,0050
2-DPMP	0,0050
MDEA	0,0050
2-fluoramfetamin	0,0050
4-metylamfetamin	0,0050
Desomorfin	0,0050
Etylkatinon	0,0050
Dimetyltryptamin (DMT)	0,0050
bk-MDDMA	0,0050
Fenmetrazin	0,010
5-MeO-DMT	0,0050
Pentedron	0,0050
4-metylmetamfetamin (4-MMA)	0,0050
25I-NBOMe	0,0050
Xylazin	0,0050
3-Fluormetamfetamin	0,0050
4-fluormetamfetamin	0,0050
N,N-dimetyl-MDA	0,0050
Katinon	0,0050
Metkatinon	0,0050

Analytt	Konsentrasjon i blod (µM)
N-desmetyldiazepam	1,3
Midazolam	0,60
Oxazepam	6,0
Metadon	0,90
Meprobamat	25
Karisoprodol	25
Morfin	0,20
Kodein	0,20
Etylmorfin	1,5
Oksykodon	0,40
Fentanyl	0,020
Amfetamin	1,1
Metamfetamin	1,1
MDMA	1,1
Tramadol	1,9
Zolpidem	0,40
Kokain	0,90
Metylfenidat	0,50
THC	0,050
LSD	0,050
Ketamin	2,3
Zopiklon	0,40
Ritalinsyre	8,6
Metaoxedrin (fenylefrin)	0,0050
Homoamfetamin (3-amino-1-fenylbutan)	0,0050
Harmin	0,0050
bk-MBDB	0,0050
N-OH-MDA	0,010
Alfa-PVP	0,0050
BDB	0,0050
MBDB	0,0050
4-MEC	0,0050
2,5-DMA	0,0050
2C-B	0,0050
2C-C	0,0050
2C-I	0,0050
2C-T-2	0,0050
2C-T-7	0,0050
2C-P	0,0050
Efedrin	0,0050

3.9.11 Overdrag i LC-MS/MS

Overdrag (*carry-over*) ble undersøkt med injeksjon av en prøve med 10 ganger høyere konsentrasjon enn Standard 6 (høyeste standard) etterfulgt av to blindprøver. Prøven ble laget med samme arbeidsløsning som ble brukt til standardene og kontrollene og fortynnet direkte med mottakerløsning (20 mM HCOOH). Prøven ble ikke ekstrahert.

Konsentrasjon i høykonsentrert prøve:

Gruppe I: 3,0 μM

Gruppe II: 6,0 μM

Gruppe III: 60 μM

Standard 6 (konsentrasjon i blod):

Gruppe I: 0,75 μM → Konsentrasjon i ekstrakt: $(0,75 \cdot 100)/250$ = 0,3 μM

Gruppe II: 1,5 μM → Konsentrasjon i ekstrakt: $(1,5 \cdot 100)/250$ = 0,6 μM

Gruppe III: 15 μM → Konsentrasjon i ekstrakt: $(15 \cdot 100)/250$ = 6,0 μM

3.9.12 Holdbarhet

Holdbarheten til ekstraktene ble testet ved å reanalysere en standardrekke og to paralleller av Kontroll 2, 4 og 6 etter én og syv dagers oppbevaring i autosampler ved 10°C, samt syv dager i fryser ved -20°C. Prosentavvik fra opprinnelig målt konsentrasjon ble beregnet.

4 Resultater og diskusjon

4.1 Optimalisering av ekstraksjonsparametere

4.1.1 Linearitet og ekstraksjonsutbytte fra vandige prøveløsninger

Innledningsvis ble det utført et linearitetsforsøk med en vandig standardrekke for å undersøke linearitet og ekstraksjonsutbytte fra vandige prøveløsninger. Hensikten var å få en første indikasjon på hvordan den nye stoffgruppen lot seg ekstrahere med PALME, men også å undersøke standardkurvene til stoffene. Uspesifikk binding av analytt til PVDF-materialet kan forekomme [22] og resultatet av dette kan bli S-formede standardkurver. De innledende forsøkene med vandig standardrekke viste imidlertid ikke tegn til uspesifikk binding.

Resultatene er presentert i avsnittene nedenfor.

Linearitet

Linearitet ble undersøkt med standardkurver, som beskrevet i metodedelens avsnitt 3.8.1. Det ble erfart at tidligere etablerte betingelser som 2 µl organisk væskemembran og 15 minutters ekstraksjonstid [22] ikke var optimale ekstraksjonsbetingelser, blant annet fordi PVDF-filteet ikke ble tilstrekkelig fuktet av 2 µl organisk løsemiddel. Standardrekken ble derfor ekstrahert med et optimalisert volum av organisk væskemembran på 3 µl (avsnitt 4.1.2) og en ekstraksjonstid på 45 minutter for å tilstrebe ekstraksjonslikevekt.

Det ble testet to ulike membraner. Diheksyleter er benyttet som væskemembran i tidligere publisert litteratur [22]. Trioktylamin ble tilsatt den ene membranen for å maskere eventuelle bindingssteder i PVDF-materialet. Ved maskering av bindingssteder regnes erfaringsmessig 1-2 % som høy nok prosentandel for å oppnå ønsket effekt.

Standardkurvene som ble regnet mot internstandarder ga noe lavere r^2 , sammenlignet med standardkurvene som ble regnet uten internstandard (**Tabell 4.1**). Internstandard skal normalt bidra til det motsatte. Årsaken til at dette ikke var tilfelle kan være det faktum at internstandard ble tilsatt før ekstraksjon, og at PALME har gitt opphav til variabilitet innad hos internstandard. Dette kan ha svekket evnen internstandard vanligvis har til å korrigere for variasjon underveis i analysen.

Standardkurvene uten internstandard ga $r^2 > 0,99$ ved bruk av begge membranene, med unntak av kurvene for 5-IT, alfa-metyltryptamin og etylfenidat. 5-IT, og delvis alfa-metyltryptamin, utpekte seg tidlig som svært problematiske å ekstrahere med PALME. Standardkurvene for etylfenidat viste at stoffet gikk i metning, trolig på grunn av for høy konsentrasjon i standardene i forhold til detektorens kapasitet. Resultatet ble krumme kurver i det høyeste konsentrasjonsområdet.

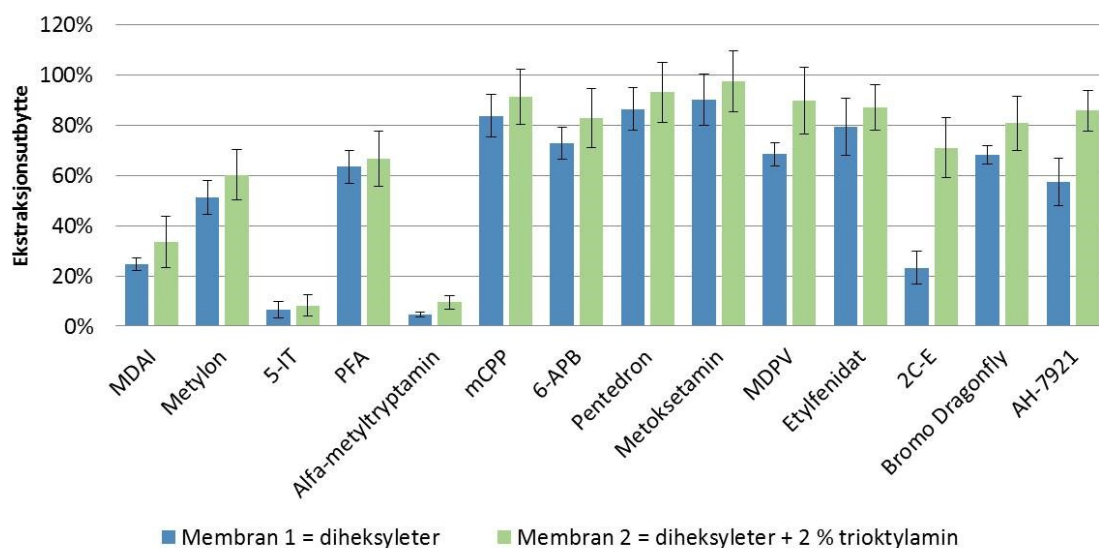
Tabell 4.1: Korrelasjonskoeffisienter (r^2) og tildelte internstandarder (IS)

	Korrelasjonskoeffisienter (r^2) og tildelt internstandard					
	Membran 1			Membran 2		
	IS	r^2 +IS	r^2 -IS	IS	r^2 +IS	r^2 -IS
MDAI	^{13}C -PMA	0,997	1,000	^{13}C -PMA	0,994	0,991
Metylon	^{13}C -PMA	0,992	0,999	^{13}C -2C-B	0,993	0,995
5-IT	^{13}C -MDA	0,869	0,917	^{13}C -PMA	0,767	0,853
PFA	^{13}C -PMA	0,995	0,999	^{13}C -MDMA	0,995	0,997
Alfa-metyltryptamin	^{13}C -PMA	0,957	0,998	^{13}C -PMA	0,875	0,963
mCPP	^{13}C -PMA	0,992	0,999	^{13}C -2C-B	0,995	0,995
6-APB	^{13}C -PMA	0,994	0,999	^{13}C -2C-B	0,993	0,996
Pentedron	^{13}C -MDA	0,994	0,999	^{13}C -Metamfetamin	0,996	0,998
Metoksetamin	^{13}C -PMA	0,993	0,999	^{13}C -2C-B	0,995	0,996
MDPV	^{13}C -MDEA	0,995	0,997	^{13}C -MDEA	0,995	0,998
Etylfenidat	^{13}C -PMA	0,871	0,897	^{13}C -2C-B	0,886	0,848
2C-E	^{13}C -2C-B	0,992	0,991	^{13}C -2C-B	0,994	0,993
Bromo DragonFLY	^{13}C -MDEA	0,996	0,997	^{13}C -MDEA	0,993	0,999
AH-7921	^{13}C -PMMA	0,995	0,997	^{13}C -2C-B	0,993	0,996

Resultatet var generelt høye korrelasjonskoeffisienter for stoffene ved bruk av begge membranene. Likevel gjaldt det for de fleste stoffene at verdiene var noe høyere for membranen som ikke var tilsatt trioktylamin. Det ble benyttet ulike internstandarder for å oppnå høyest r^2 for de to membranene. Internstandarder bør derfor evalueres for nye væskemembraner. Likevel, på grunn av tidsmangel, ble tildelte internstandarder for vandige prøveløsninger med diheksyleter som membran benyttet videre, til tross for at det på et senere tidspunkt ble bestemt et annet organisk løsemiddel som organisk væskemembran ved ekstraksjon fra biologiske prøveløsninger.

Ekstraksjonsutbytte

Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte ble beregnet for de seks standardene som ble brukt til å undersøke linearitet fra vandige prøveløsninger (n=4). Ekstraksjonsutbyttet ble vurdert med tanke på konsentrasjonsavhengighet og en eventuell forskjell mellom Membran 1 og 2. Ekstraksjonsutbyttet for begge membranene var forholdsvis uavhengig av konsentrasjon (**Vedlegg 1**). **Figur 18** viser gjennomsnittet av gjennomsnittsverdiene for de seks standardene for de to membranene. Standardavviket (SD) for ekstraksjonsutbyttet til de seks standardene er lagt inn i figuren som feilestimat.



Figur 18: Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte for seks standarder med Membran 1 og 2 (n=4)

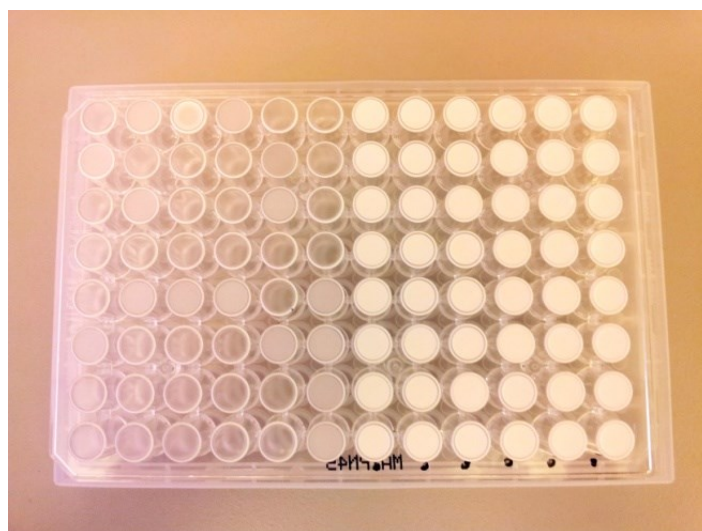
Det var en økning i gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte for samtlige stoffer ved tilsetning av trioktylamin til membranen. Tilsetning av trioktylamin ble derfor vurdert som et bidrag til å oppnå høyere gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte, men noe høyere standardavvik for enkelte stoffer ved bruk av Membran 2 ble observert. Økningen kan skyldes at trioktylamin reduserte en eventuell uspesifikk binding til membranen, selv om uspesifikk binding først og fremst er relatert til konsentrasjonsavhengig ekstraksjonsutbytte [22]. Selv om det ikke ble observert et konsentrasjonsavhengig ekstraksjonsutbytte for noen av membranene betyr ikke det nødvendigvis at uspesifikk binding ikke forekom. Det kan like gjerne skyldes at stoffene ekstraheres forholdsvis lett fra vandige prøveløsninger.

Generelt er ekstraksjonsutbyttet noe lavere for de første stoffene i figuren (MDAI, metylon, 5-IT, PFA og alfa-metyltryptamin). Disse stoffene har også noe lavere log P -verdier (**Tabell 3.1**) enn de andre analyttene, noe som kan tyde på en trend med tanke på log P og overgang til organisk fase (væskemembranen). Dette stemmer overens med **Ligning 1**, avsnitt 2.3.1.

4.1.2 Organisk væskemembran

Volum (optimalisert med vandig prøveløsning)

Figur 19 viser en mottakerplate som er vendt opp ned, med PVDF-filtre tilsatt organisk løsemiddel på venstre halvdel. Filtrene ble stort sett transparente ved fukting, men enkelte ble mer matte av utseende. Bildet ble tatt før membranvolum ble optimalisert, og tredje membran øverst fra venstre er tiltenkt å vise hvordan enkelte filtre ikke ble tilstrekkelig fuktet dersom membranvolumet var for lavt (2 μ l i dette tilfellet).



Figur 19: PVDF-filtre tilsatt 2 μ l organisk løsemiddel

Et forsøk ble utført som beskrevet i metodedelens avsnitt 3.8.2 (Volum) for å undersøke ekstraksjonsutbytte og RSD for oppnådd signalintensitet med fire ulike membranvolum og tre ulike ekstraksjonstider. Membranvolum på 2 μ l ble inkludert fordi det representerte tidligere etablerte betingelser [22]. På forhånd var det ikke kjent om tilstrekkelig fukting av filtrene var avgjørende for å oppnå best resultat.

Ekstraksjonsutbytte og RSD ble undersøkt som funksjon av membranvolum og ekstraksjonstid. Se **Vedlegg 2** og **3** for oversikt over gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte og

RSD som ble oppnådd med de ulike membranvolumene (n=4) og ekstraksjonstidene (n=3). Gjennomsnittsverdiene nederst i vedleggstabellene er basert på ekstraksjonstid, og er gjengitt her i **Tabell 4.2**.

Tabell 4.2: Gjennomsnittsverdiene for ekstraksjonsutbytte og RSD basert på ekstraksjonstid

	Membran 1		Membran 2	
	Utbytte	RSD	Utbytte	RSD
15 min.	61 %	22 %	82 %	14 %
20 min.	80 %	7 %	98 %	12 %
30 min.	80 %	10 %	95 %	12 %

Tallene ble brukt til å konkludere for Membran 1 eller 2. Lav spredning i analyseresultatene (RSD) ble ansett som viktigere enn høyt ekstraksjonsutbytte. Membran 2 ga høyere gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte enn Membran 1 for alle ekstraksjonstidene, men lavest RSD for signalintensiteten ble i dette forsøket oppnådd med Membran 1 (diheksyleter) og 20 minutters ekstraksjonstid. Dette ga en RSD på 7 % mot en RSD på 12 % med tilsvarende betingelser for Membran 2. Membran 1 ble ansett som best med hensyn på lavest mulig spredning. Beregnede gjennomsnittsverdier for Membran 1 er oppsummert i **Tabell 4.3**.

Tabell 4.3: Gjennomsnittsverdier for Membran 1 (diheksyleter)

	Membran 1					
	Utbytte			RSD		
	15 min.	20 min.	30 min.	15 min.	20 min.	30 min.
2,0 µl	55 %	78 %	75 %	25 %	8 %	16 %
2,5 µl	54 %	82 %	80 %	46 %	6 %	8 %
3,0 µl	68 %	80 %	83 %	5 %	5 %	7 %
3,5 µl	68 %	80 %	83 %	13 %	10 %	11 %

Tabellen viser at lavest RSD ble oppnådd med 3 µl som membranvolum. Konklusjonen var derfor at optimale betingelser ble oppnådd med 3 µl diheksyleter (20 minutter ekstraksjonstid). Konklusjonen kan imidlertid diskuteres. For det første var forskjellen i RSD mellom de to membranene relativt liten, spesielt for de to lengste ekstraksjonstidene (**Tabell 4.2**). For det andre oppnådde flere av stoffene et betraktelig lavere ekstraksjonsutbytte uten trioktylamin tilsatt til membranen (**Vedlegg 2**). Dette gjaldt særlig for MDAI, 5-IT, alfa-metyltryptamin og 2C-E. For det tredje ble endelig ekstraksjonstid bestemt til 40 minutter på et senere tidspunkt (avsnitt 4.1.3). Å konkludere membranvolum med en ekstraksjonstid som

er halvparten så lav blir noe usikkert. Betydningen ekstraksjonstiden kan ha for ekstraksjonsutbyttet fremkommer senere i denne oppgaven (avsnitt 4.1.3).

Tilsvarende gjennomsnittsverdier som ble beregnet for Membran 1 (**Tabell 4.2**) er oppsummert for Membran 2 i **Tabell 4.4**. Tallene ble beregnet etter at membranvolum var konkludert, men viser at det kan være grunn til å revurdere konklusjonen fra forsøket. Membran 2 ga like lav RSD, men høyere ekstraksjonsutbytte enn Membran 1.

Tabell 4.4: Gjennomsnittsverdier for Membran 2 (diheksyleter + 2 % trioktylamin)

	Membran 2					
	Utbytte			RSD		
	15 min.	20 min.	30 min.	15 min.	20 min.	30 min.
2,0 µl	61 %	85 %	88 %	11 %	30 %	19 %
2,5 µl	77 %	102 %	89 %	34 %	5 %	17 %
3,0 µl	94 %	105 %	101 %	5 %	5 %	6 %
3,5 µl	95 %	100 %	102 %	6 %	8 %	4 %

I **Tabell 4.5** sammenlignes Membran 1 og 2 med gjennomsnittsverdiene for de fire membranvolumene. Tallene er basert på et gjennomsnitt av samtlige stoffers gjennomsnittlige ekstraksjonsutbytte (n=3) for de tre ekstraksjonstidene. Forskjellen i ekstraksjonsutbytte for de ulike ekstraksjonstidene kommer ikke frem, på lik måte som forskjellen mellom de ulike membranvolumene ikke kom frem i **Tabell 4.2**. Dette ville likevel vært et mer fornuftig beslutningsgrunnlag, ettersom det var membranvolum som til slutt skulle bestemmes, og ikke ekstraksjonstid. Tabellen viser at membranen som ble tilsatt trioktylamin ga både høyere ekstraksjonsutbytte (+23 %) og lavere RSD (-1 %) for det valgte membranvolumet.

Tabell 4.5: Gjennomsnittsverdier for ekstraksjonsutbytte og RSD basert på membranvolum

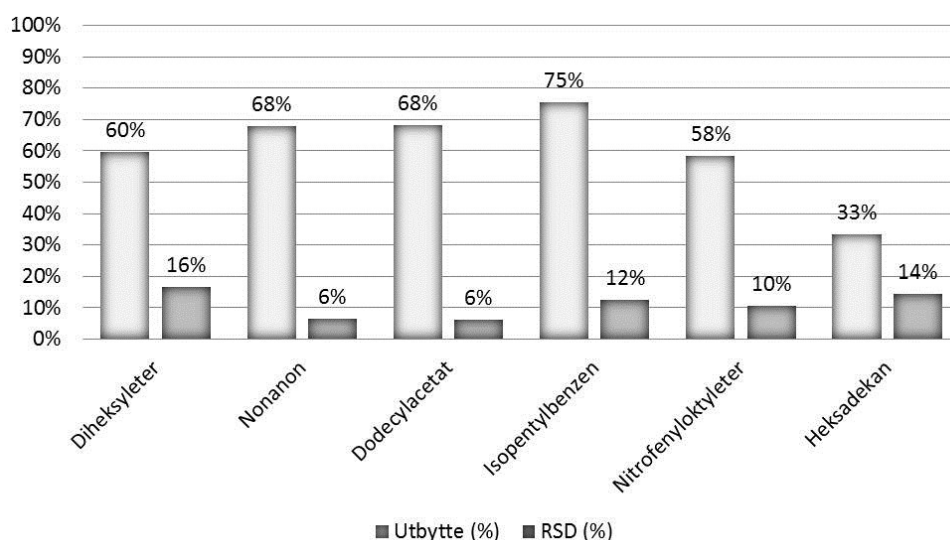
	Membran 1		Membran 2	
	Utbytte	RSD	Utbytte	RSD
2,0 µl	69 %	16 %	78 %	20 %
2,5 µl	72 %	20 %	89 %	19 %
3,0 µl	77 %	6 %	100 %	5 %
3,5 µl	77 %	11 %	99 %	6 %

Ettersom konklusjonen fra forsøket likevel var 3 µl diheksyleter (Membran 1) som optimalisert organisk væskemembran ble ikke trioktylamin tilsatt membranene som er beskrevet under valg av løsemiddel.

Valg av organisk løsemiddel (optimalisert med biologisk prøveløsning)

Det er tidligere vist at ekstraksjonsutbytte, RSD og selektivitet i stor grad ble påvirket av løsemidlet som var benyttet som væskemembran [22]. Et forsøk ble utført som beskrevet i avsnitt 3.8.2 (Valg av organisk løsemiddel) for å undersøke ekstraksjonsutbytte og RSD for oppnådd signalintensitet med seks ulike organiske væskemembraner. Resultatet er fremstilt i **Figur 20**.

Løsemidlene, med unntak av nonanon, er beskrevet i tidligere publisert litteratur [56]. Nonanon ble valgt på grunnlag av resultatene fra et annet (foreløpig upublisert) masterprosjekt som hadde hovedfokus på optimalisering av væskemembranen i forbindelse med PALME.



Figur 20: Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte og RSD for oppnådd signalintensitet (n=4) med seks ulike væskemembraner

Isopentylbenzen ga høyest gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte (75 %), men dobbelt så høy gjennomsnittlig RSD (12 %) for oppnådd signalintensitet sammenlignet med dodecylacetat og nonanon (6 % RSD for begge). Lavere RSD ble vurdert som mer gunstig enn høyere ekstraksjonsutbytte. Dodecylacetat og nonanon ga like høyt gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte (68 %) og like lav gjennomsnittlig RSD (6 %) for signalintensiteten. Signalintensiteten med nonanon som membran ga likevel høyere RSD i flest enkelttilfeller sammenlignet med dodecylacetat når gjennomsnittlig RSD for hvert stoff ble sammenlignet.

for de to membranene. Dodecylacetat ble derfor valgt som optimalisert organisk væskemembran ved ekstraksjon fra blod.

Som nevnt under *Volum* (s. 59-61) burde membranene også blitt testet med tilsetning av trioktylamin. Dette ville vært spesielt interessant å teste for dodecylacetat og nonanon, for å undersøke om trioktylamin ville gitt et tydeligere skille mellom de to membranene.

4.1.3 Ekstraksjonstid

Ekstraksjonstid ble undersøkt ved å vurdere ekstraksjonsutbytte som funksjon av tid, med entydig resultat: økt ekstraksjonsutbytte for samtlige stoffer med økende ekstraksjonstid (**Tabell 4.6**). RSD ble også vurdert og er oppsummert i samme tabell. RSD-verdiene varierte i større grad. Dette tydet på at ekstraksjonstiden hadde større betydning for ekstraksjonsutbyttet, og at RSD ikke ble påvirket i like stor grad. Ekstraksjonsutbyttet for Bromo DragonFLY er ikke inkludert i tabellen fordi utgangsløsningen ga svært lavt signal og førte til omfattende overestimering av ekstraksjonsutbyttet. Årsaken til dette er ikke kjent.

Tabell 4.6: Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte og RSD for tre ulike ekstraksjonstider (n=4)

	Utbytte			RSD		
	20 min.	30 min.	40 min.	20 min.	30 min.	40 min.
MDAI	14 %	21 %	30 %	9 %	6 %	4 %
Metylon	34 %	42 %	56 %	1 %	5 %	6 %
5-IT	10 %	10 %	17 %	16 %	20 %	20 %
PFA	44 %	54 %	70 %	6 %	6 %	3 %
Alfa-metyltryptamin	4 %	9 %	13 %	41 %	40 %	41 %
mCPP	81 %	94 %	111 %	4 %	7 %	2 %
6-APB	50 %	62 %	79 %	6 %	6 %	3 %
Pentedron	90 %	95 %	104 %	4 %	6 %	1 %
Metoksetamin	88 %	96 %	105 %	4 %	6 %	3 %
MDPV	72 %	82 %	93 %	6 %	7 %	3 %
Etylfenidat	76 %	85 %	98 %	6 %	7 %	1 %
2C-E	5 %	10 %	19 %	10 %	6 %	2 %
Bromo DragonFLY	-	-	-	6 %	3 %	7 %
AH-7921	82 %	94 %	117 %	9 %	11 %	10 %
Gjennomsnitt:	50 %	58 %	70 %	9 %	10 %	8 %

Økt ekstraksjonstid ga økt ekstraksjonsutbytte, men ekstraksjonstid utover 40 minutter ble ikke testet fordi hensikten med oppgaven var effektivisering og minst mulig tidsbruk. Ekstraksjonstiden ble dermed bestemt til 40 minutter.

4.1.4 Basetilsetning (pH i prøveløsningen)

Første ekstraksjon fra blod ble utført med standarder som bestod av arbeidsløsning fortynnet direkte med fullblod. Standardene ble vortex-ristet før tilsetning til PALME-bunnplaten for å sikre homogen fordeling av analytt. Dette førte til at blodet skummet, og det ble vanskelig å pipettere nøyaktige volum til bunnplaten.

Resultatet etter første ekstraksjon var et lavere ekstraksjonsutbytte for stoffene med høyest pKa-verdi. Dette kunne skyldes for lav pH i prøveløsningen og følgelig en høyere grad av protonering av de basiske analyttene, noe som er til hinder for overgang til organisk fase. Et baseforsøk ble utført for å undersøke dette, beskrevet i avsnitt 3.8.4.

Fem konsentrasjoner av NaOH ble testet i første forsøk. Ekstraksjonsutbyttet økte med økende konsentrasjon av NaOH (**Tabell 4.7**). Derfor ble et nytt baseforsøk utført der to enda høyere konsentrasjoner ble testet: 80 og 100 mM. Høyest gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte ble oppnådd med 80 mM NaOH. En mengde på 75 µl 80 mM NaOH ble derfor valgt som optimalisert basetilsetning ved ekstraksjon fra blod.

Tabell 4.7: Ekstraksjonsutbytte med økende molar konsentrasjon NaOH tilsatt til prøveløsningen

	Utbytte				
	10mM	20mM	30mM	40mM	60mM
MDAI	1 %	2 %	5 %	8 %	16 %
Metylon	14 %	27 %	43 %	51 %	59 %
5-IT	0 %	0 %	2 %	2 %	7 %
PFA	6 %	14 %	37 %	57 %	77 %
Alfa-metyltryptamin	0 %	0 %	0 %	1 %	4 %
mCPP	44 %	59 %	72 %	81 %	92 %
6-APB	6 %	16 %	38 %	55 %	75 %
Pentedron	114 %	116 %	113 %	119 %	116 %
Metoksetamin	110 %	115 %	115 %	120 %	119 %
MDPV	92 %	99 %	95 %	103 %	99 %
Etylfenidat	100 %	107 %	108 %	113 %	114 %
2C-E	1 %	1 %	5 %	9 %	18 %
Bromo DragonFLY	22 %	37 %	51 %	67 %	69 %
AH-7921	58 %	69 %	67 %	76 %	68 %

I publisert litteratur ble en 400 µl plasmaprøve gjort basisk med 200 µl 20 mM NaOH [22]. Basen utgjorde i det tilfellet 10 mM i prøveløsningen. I denne oppgaven ble en 250 µl blodprøve gjort basisk med 75 µl 20 mM NaOH, noe som ga en tilsvarende verdi på 6,0 mM NaOH. Tilsetning av 75 µl 80 mM NaOH ga derimot en sluttkonsentrasjon på 24 mM. Dette

tilsvarte en fire ganger økning i konsentrasjon i forhold til det som først ble brukt, og 2,4 ganger økning i forhold til det som tidligere er publisert. Blodets bufferkapasitet ($\text{pH} \approx 7,2$) vanskeliggjør likevel en direkte sammenligning av pH, spesielt mellom en plasma- og fullblodprøve. Analyttenes pK_a -verdier er også vesentlige i vurderingen av optimal pH.

Tabell 4.8 oppsummerer de målte pH-verdiene i prøveløsning, mottakerløsning og ekstrakt.

Tabell 4.8: pH i biologisk prøveløsning, mottakerløsning og ekstrakt

Prøveløsning	Mottakerløsning	Ekstrakt
$\text{pH} > 10$	$\text{pH} \approx 3$	$\text{pH} \approx 3-4$

pH-målingene som ble utført viste at en sluttkonsentrasjon på 24 mM NaOH i prøveløsningen ga $\text{pH} > 10$, som er høyere enn samtlige analytters pK_a -verdi. $\text{pH} \approx 3$ i mottakerløsningen viste at ekstraksjonen drives av en pH-gradient, og $\text{pH} \approx 3-4$ i ekstraktet viste at pH-gradienten ble opprettholdt under ekstraksjon.

4.1.5 Volum av mottakerløsning ved bruk av multikanalpipette

Til de innledende forsøkene ble det benyttet et prøvevolum på 250 μl og et mottakervolum på 50 μl . Dette ga i teorien mulighet for fem ganger oppkonsentrering. Oppkonsentrering er en stor fordel dersom analytt foreligger i lav konsentrasjon, eller man ønsker lavest mulig MDK og MKK. Testsubstansene i denne oppgaven bestod hovedsakelig av stoffer som det finnes lite informasjon om når det gjelder vanlige kvantifiseringsnivå (med noen unntak, se avsnitt 4.2.5). Det var derfor uvisst på forhånd i hvilken grad stoffene var avhengig av oppkonsentrering for å la seg detektere.

Pipettering av ulike mottakervolum med 8-kanalpipette

Hensikten med pipetteutprøvingen var å effektivisere ekstraktoverføring til ny bunnplate, fra PALME-oppsettet, som kan plasseres direkte i LC-MS/MS-instrumentet. Dette vil være svært gunstig fordi enkeltvis overføring til vialer er tidkrevende. Dersom en 8-kanalpipette kunne brukes ville en 96-kanalpipette kunne brukes på tilsvarende måte, med ytterligere økt effektivitet og tidsbesparelse. Det er imidlertid viktig å ikke ødelegge membranen. I tillegg må mottakervolumet være stort nok til at injeksjonsnålen i instrumentet når ned til løsningen som skal injiseres. Instrumentparametere som styrer hvor langt ned nålen går må også tilpasses dersom dette systemet skal benyttes.

Konklusjonen fra pipetteringstesten var at 250 µl mottakerløsning lettest lot seg pipettere med 8-kanalpipetten, og det bør overføres et volum på minimum 200 µl til ny bunnplate for å sikre at injeksjonsnålen i analyseinstrumentet når ned til løsningen som skal injiseres.

Mottakervolumets medvirkning til oppkonsentrering

I MDK-forsøket (avsnitt 4.2.4) ble det testet to ulike mottakervolum: 50 og 250 µl. Hensikten var å undersøke om ulike volumforhold var utslagsgivende for ekstraksjonsutbyttet. Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte for de to volumene ble sammenlignet på to konsentrasjonsnivå (tilsvarende 0,25 og 0,50 µM i blod). Prosentandeler av topphøyden ved 250 µl ble for hvert enkelt stoff beregnet i forhold til topphøyden ved 50 µl. Gjennomsnittet av disse andelene ble beregnet til 20 % for begge konsentrasjonsnivå; topphøydene for 250 µl mottakerløsning utgjorde altså én femtedel av topphøydene for 50 µl mottakerløsning. Dette var noe overraskende, ettersom økt mottakervolum vanligvis gir høyere ekstraksjonsutbytte ved væske-væske-ekstraksjon, men samtidig bekreftet det at fem ganger lavere mottakervolum ga fem ganger oppkonsentrering. Mottakervolumet bestemte grad av oppkonsentrering i forsøket uten å påvirke ekstraksjonsutbyttet. Resultatene som dannet grunnlag for denne konklusjonen kan sees i **Vedlegg 4**.

4.1.6 Testing av overdrag mellom brønnene under ekstraksjon

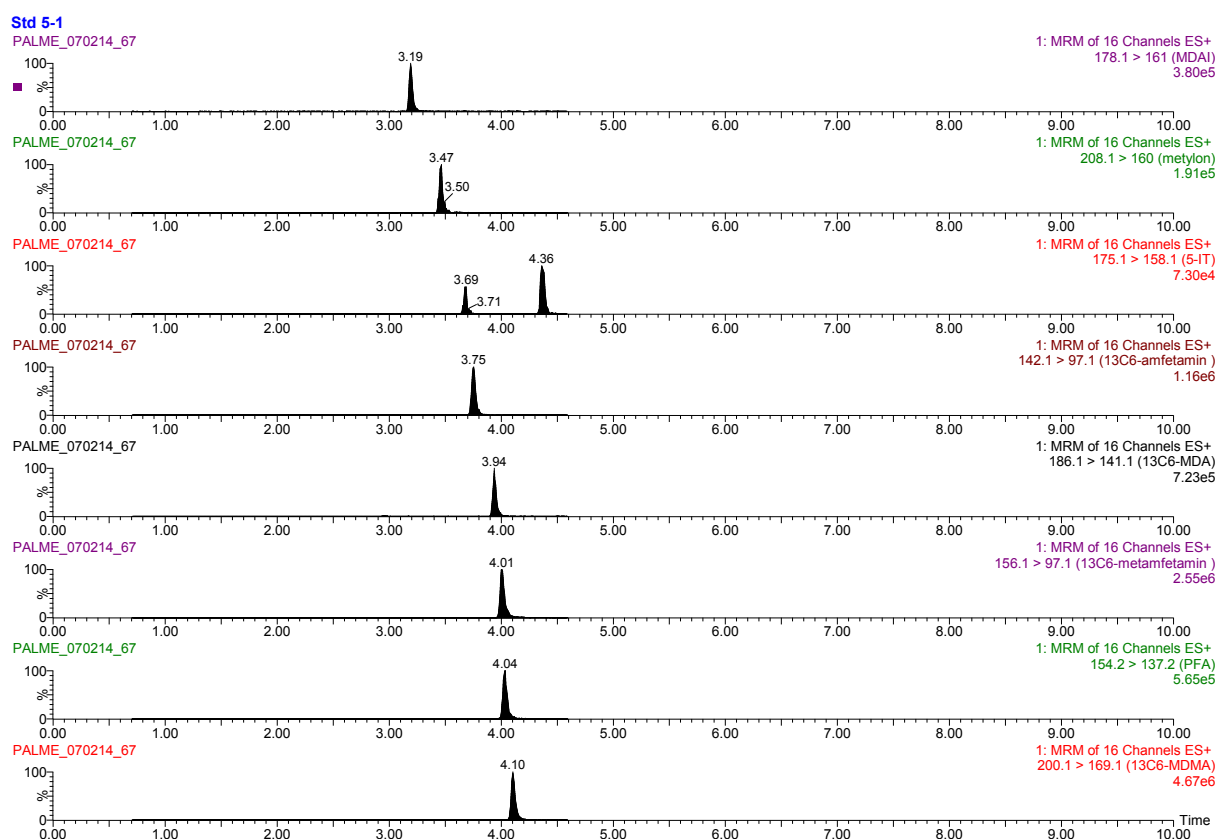
I samtlige analyser ble det analysert minimum én blindprøve. En blindprøve uten kromatografiske topper er en bekreftelse på at matriks eller andre løsninger som inngår i analysen ikke inneholder interfererende substanser [2].

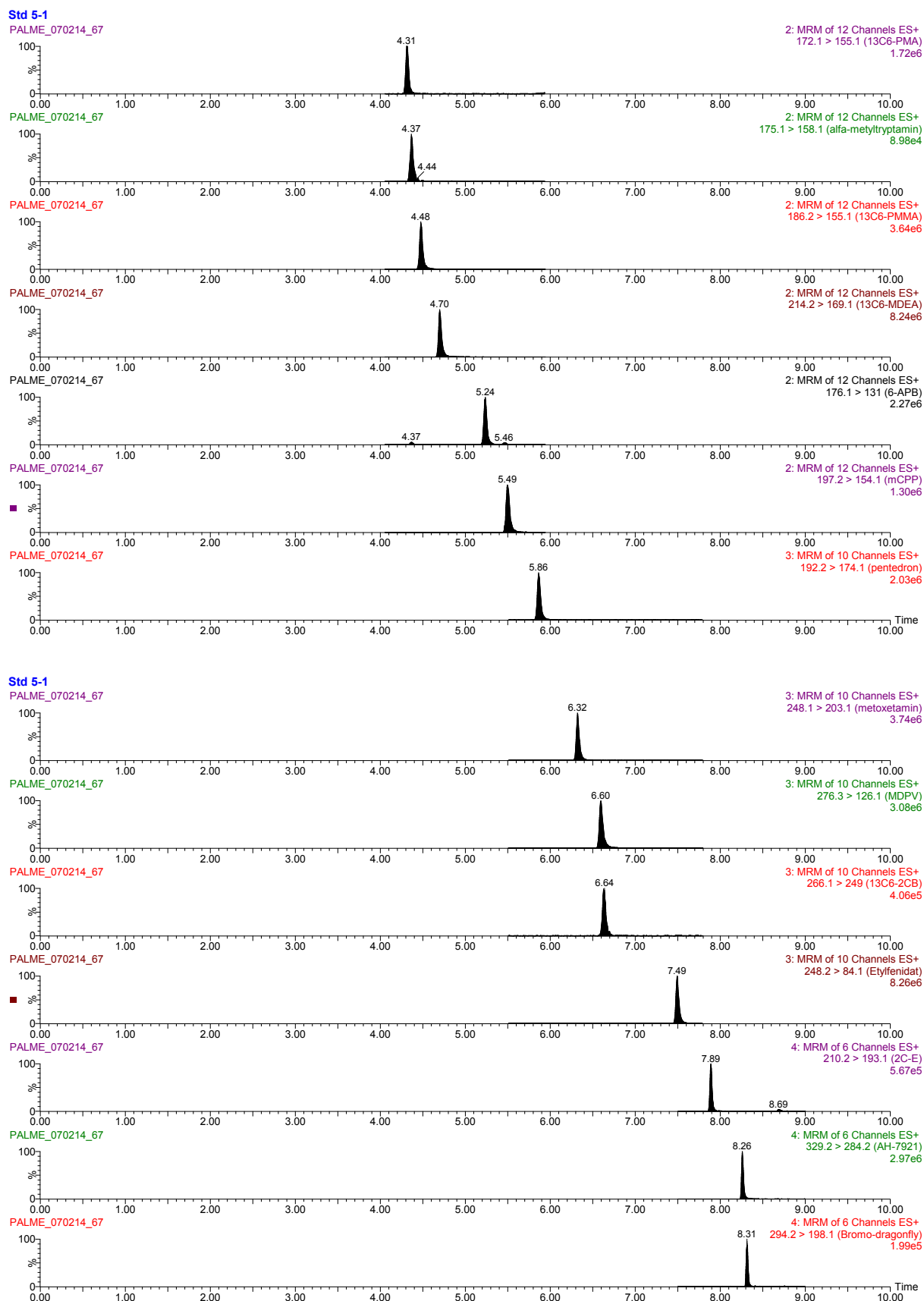
Etter ett av de innledende forsøkene ble det observert kromatografiske topper i blindprøvene. Dette var etter et forsøk hvor det hadde vært problematisk å kneppe sammen PALME-platene før ekstraksjon, og hvor det etter endt ekstraksjon ble observert blodspor i to av brønnene som ikke var brukt. Mulighet for overdrag mellom brønnene under ekstraksjon ble derfor vurdert. Den relativt høye viskositeten til blod, sammenlignet med den til vandige prøver, og det faktum at blod skummer ved risting ville eventuelt kunne føre til overdrag til nabobrønnene. Et forsøk ble utført for å avdekke om mistanken var berettiget (avsnitt 3.8.6), men det var den ikke. Kromatogrammene fra forsøket viste signalfrie blindprøver, altså var overdraget fra det ene forsøket et engangstilfelle.

4.2 Validering av metoden

4.2.1 Identifikasjon

Retensjonstider og overganger basert på en biologisk prøveløsning tilsatt Standard 5 er vist i **Figur 21**. Figuren viser at 14 stoffer og åtte internstandarder ble separert på i underkant av ni minutter. En del stoffer koeluerte, men den kromatografiske separasjonen var tilfredsstillende fordi responsen i massespektrometret ikke ble påvirket av koelueringen. Stoffene med tilnærmet lik retensjonstid hadde ulike m/z for sine respektive overganger og ble derfor presist detektert. Kromatogrammet for 5-IT hadde en blindtopp med retensjonstid 4,36 min. som tilhørte alfa-metyltryptamin. Dette kom av at 5-IT og alfa-metyltryptamin er isomere forbindelser [57]. Kromatografisk separasjon av isomere forbindelser med like overganger er nødvendig ved MS/MS-analyse.



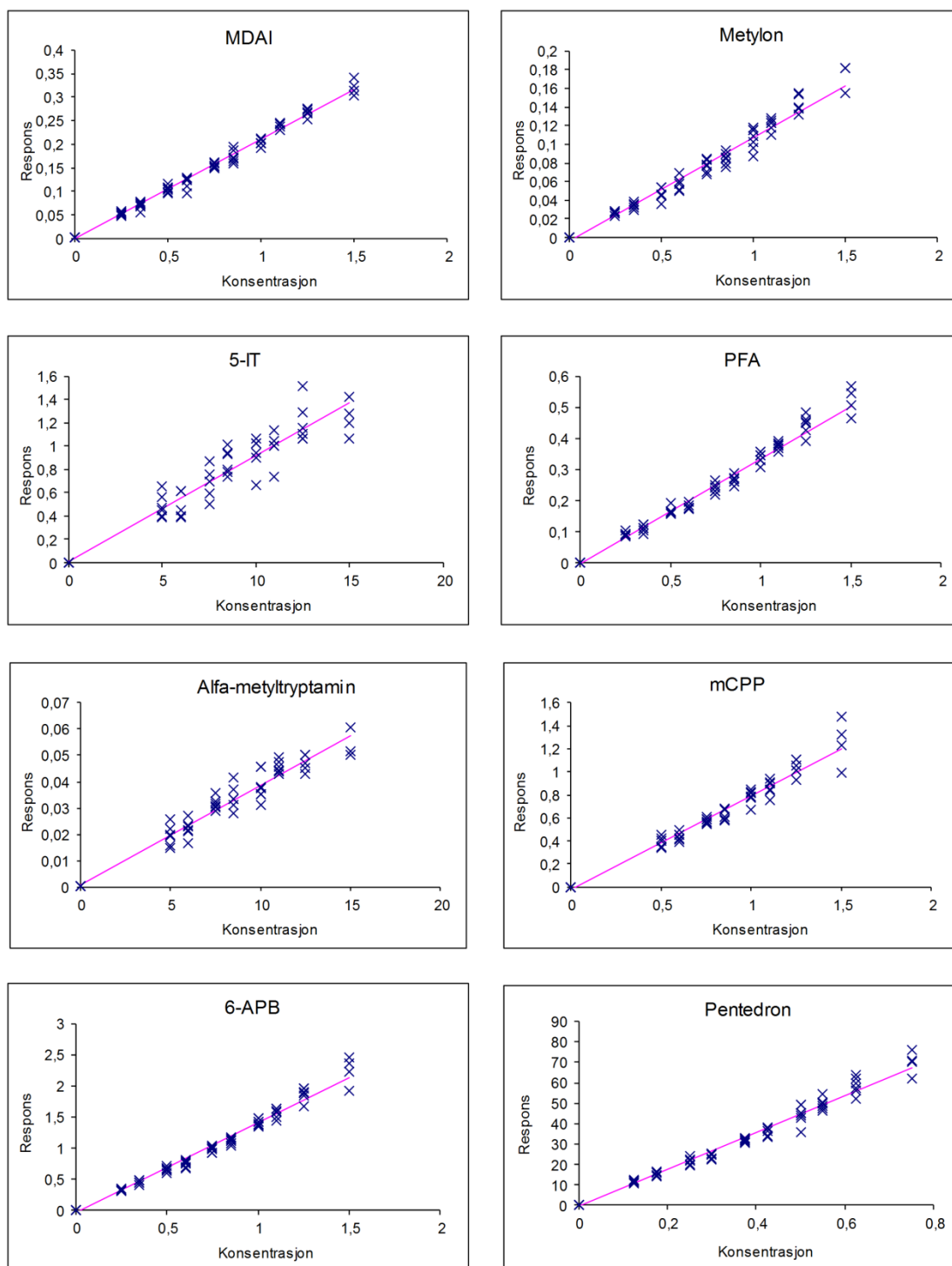


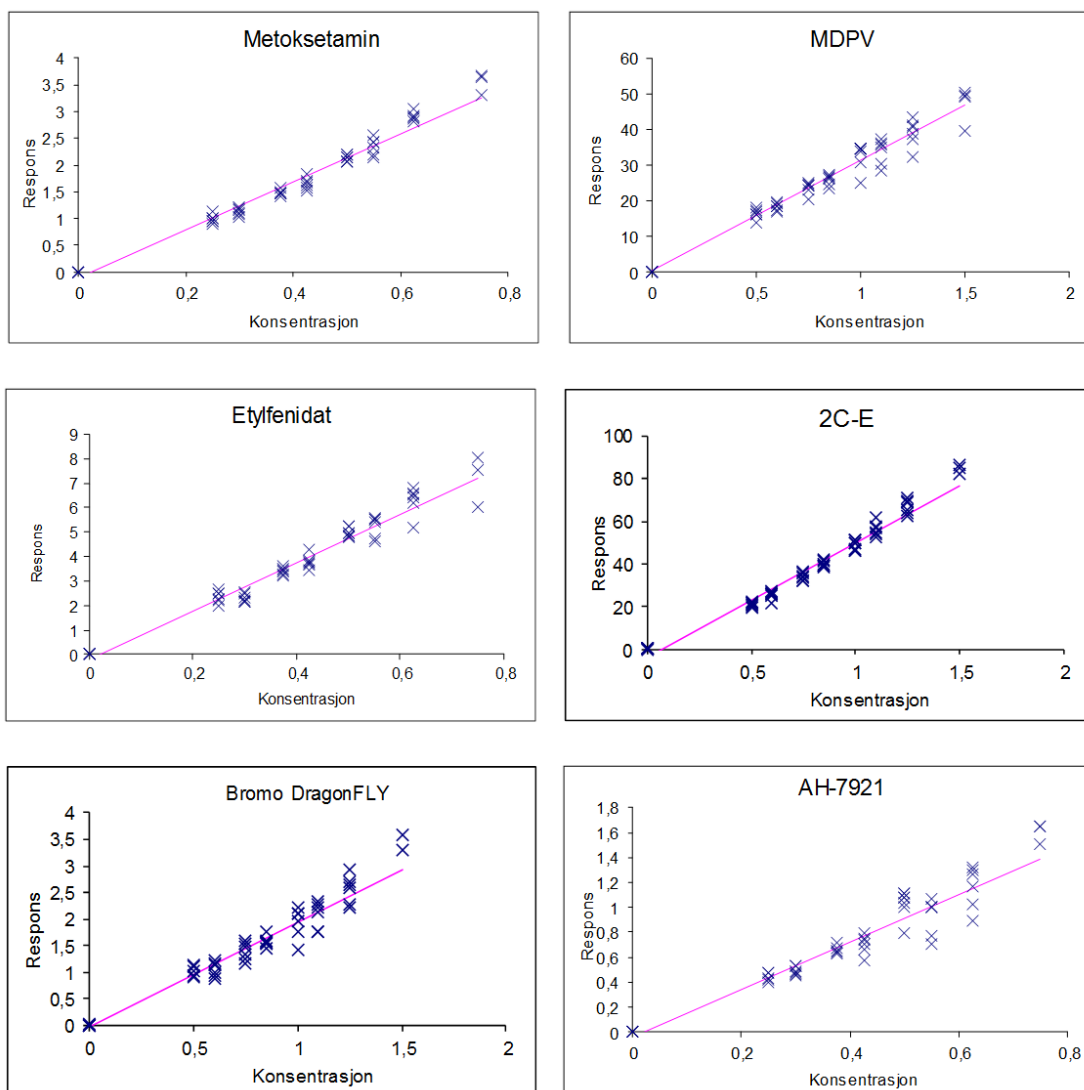
Figur 21: Kromatogrammer for analyttene og internstandarder, sortert etter retensjonstid

4.2.2 Linearitet

Linearitet fremkommer av standardkurver med tilhørende regresjonslinje ($y = ax + b$) [2].

Figur 22 viser standardkurvene for samtlige stoffer.





Figur 22: Standardkurver

Måleområdet for kurvene og tilhørende r^2 er oppsummert i **Tabell 4.9**. Kurvene skal ideelt gi r^2 på $\geq 0,99$, men lavere verdier kan godtas dersom metoden skal brukes til screening med påvisning av positivt eller negativt resultat, og ikke til kvantifisering [2].

Tabell 4.9: Standardkurvenes måleområde og tilhørende korrelasjonskoeffisient (r^2)

Stoffnavn	Internstandard	Kalibrering	Måleområde (μM)	r^2
MDAI	$^{13}\text{C6-PMA}$	1/x-veking	0,25 - 1,5	0,991
Metylon	$^{13}\text{C6-PMA}$	1/x-veking	0,25 - 1,5	0,975
5-IT	$^{13}\text{C6-MDA}$	1/x-veking	5,0 - 15	0,916
PFA	$^{13}\text{C6-PMA}$	1/x-veking	0,25 - 1,5	0,985
Alfa-metyltryptamin	$^{13}\text{C6-PMA}$	1/x-veking	5,0 - 15	0,940
mCPP	$^{13}\text{C6-PMA}$	1/x-veking	0,50 - 1,5	0,970
6-APB	$^{13}\text{C6-PMA}$	1/x-veking	0,25 - 1,5	0,986
Pentedron	$^{13}\text{C6-MDA}$	1/x-veking	0,13 - 0,75	0,984
Metoksetamin	$^{13}\text{C6-PMA}$	1/x-veking	0,25 - 0,75	0,977
MDPV	$^{13}\text{C6-MDEA}$	1/x-veking	0,50 - 1,5	0,972
Etylfenidat	$^{13}\text{C6-PMA}$	1/x-veking	0,25 - 0,75	0,968
2C-E	$^{13}\text{C6-2C-B}$	1/x-veking	0,50 - 1,5	0,976
Bromo DragonFLY	$^{13}\text{C6-MDEA}$	1/x-veking	0,50 - 1,5	0,950
AH-7921	$^{13}\text{C6-PMMA}$	1/x-veking	0,25 - 0,75	0,942

MDAI, PFA og 6-APB ga $r^2 \geq 0,99$. Dette er svært gunstig med tanke på kvantifisering: høy r^2 tyder på god korrelasjon mellom konsentrasjon i prøven og detektorrespons og dermed god linearitet for standardkurven. Metylon, pentedron, metoksetamin og 2C-E ga akseptabel presisjon med $r^2 \geq 0,98$. 5-IT, alfa-metyltryptamin, mCPP, MDPV, etylfenidat, Bromo DragonFLY og AH-7921 ga $r^2 < 0,98$, noe som kan føre til en mer upresis kvantifisering.

Standardkurver med alle elleve konsentrasjonsnivå inkludert ga høyere r^2 . Verdiene kan sees i **Vedlegg 5**.

4.2.3 Presisjon og nøyaktighet

Presisjon angir spredningen i analyseresultatene [2] og er i denne oppgaven oppgitt som RSD [54].

Nøyaktighet angir avviket mellom referanseverdi (sann verdi, X_t) og gjennomsnittlig analyseresultat (estimert verdi, X). Nøyaktighet oppgis i denne oppgaven som relativ nøyaktighet; prosent ekstraksjonsutbytte i forhold til sann verdi ($(X/X_t) \times 100\%$) [2].

Presisjon, både innen og mellom serie, og nøyaktighet skal helst være innenfor 15 % RSD, men verdier opp mot 20 % RSD kan aksepteres for konsentrasjoner i nærheten av deteksjonsgrensen [54].

Repeterbarhet og nøyaktighet (innen serie variasjon)

Resultatet for presisjon og nøyaktighet innen serie er presentert i **Tabell 4.10** sammen med teoretiske og målte konsentrasjoner.

Tabell 4.10: Repeterbarhet (teoretiske og målte konsentrasjoner er oppgitt som μM)

		Kontroll 2 n=10	Kontroll 3 n=10	Kontroll 4 n=10	Kontroll 5 n=10	Kontroll 6 n=10
MDAI	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,23	0,45	0,71	0,88	1,1
	RSD	5 %	6 %	4 %	7 %	4 %
	Nøyaktighet	90 %	89 %	95 %	88 %	89 %
Metylon	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,23	0,38	0,59	0,83	1,1
	RSD	13 %	13 %	8 %	7 %	9 %
	Nøyaktighet	91 %	75 %	79 %	83 %	87 %
5-IT	Teoretisk	2,5	5,0	7,5	10	12,5
	Målt	3,0	6,2	8,3	11,6	12,8
	RSD	22 %	16 %	19 %	13 %	9 %
	Nøyaktighet	119 %	123 %	111 %	116 %	102 %
PFA	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,14	0,32	0,49	0,64	0,89
	RSD	13 %	8 %	9 %	6 %	8 %
	Nøyaktighet	57 %	64 %	65 %	64 %	71 %
Alfa-metyltryptamin	Teoretisk	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5
	Målt	2,4	5,0	8,0	9,6	12,6
	RSD	26 %	24 %	13 %	11 %	12 %
	Nøyaktighet	95 %	100 %	107 %	96 %	101 %

mCPP	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,22	0,41	0,60	0,80	1,1
	RSD	9 %	9 %	8 %	6 %	9 %
	Nøyaktighet	87 %	81 %	81 %	80 %	85 %
6-APB	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,22	0,43	0,65	0,90	1,2
	RSD	5 %	5 %	6 %	4 %	4 %
	Nøyaktighet	89 %	85 %	86 %	90 %	96 %
Pentedron	Teoretisk	0,13	0,25	0,38	0,50	0,63
	Målt	0,11	0,21	0,31	0,43	0,55
	RSD	7 %	8 %	5 %	4 %	6 %
	Nøyaktighet	88 %	85 %	82 %	86 %	89 %
Metoksetamin	Teoretisk	0,13	0,25	0,38	0,50	0,63
	Målt	0,12	0,21	0,31	0,42	0,55
	RSD	7 %	8 %	8 %	5 %	6 %
	Nøyaktighet	93 %	85 %	84 %	85 %	89 %
MDPV	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,24	0,46	0,67	0,93	1,2
	RSD	2 %	7 %	7 %	3 %	4 %
	Nøyaktighet	96 %	92 %	89 %	93 %	94 %
Etylfenidat	Teoretisk	0,13	0,25	0,38	0,50	0,63
	Målt	0,098	0,19	0,26	0,34	0,45
	RSD	9 %	10 %	10 %	7 %	6 %
	Nøyaktighet	78 %	74 %	70 %	69 %	72 %
2C-E	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,21	0,43	0,69	0,99	1,4
	RSD	8 %	4 %	7 %	3 %	5 %
	Nøyaktighet	85 %	87 %	92 %	99 %	109 %
Bromo DragonFLY	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,22	0,49	0,74	1,1	1,5
	RSD	18 %	19 %	14 %	7 %	5 %
	Nøyaktighet	87 %	99 %	99 %	112 %	117 %
AH-7921	Teoretisk	0,13	0,25	0,38	0,50	0,63
	Målt	0,097	0,18	0,27	0,41	0,52
	RSD	10 %	18 %	16 %	7 %	7 %
	Nøyaktighet	78 %	74 %	72 %	81 %	83 %

Ni av 14 stoffer var innenfor grensen på ± 20 %: MDAI, alfa-metyltryptamin, mCPP, 6-APB, pentedron, metoksetamin, MDPV, 2C-E og Bromo DragonFLY. Noen av stoffene viste lav nøyaktighet på samtlige nivå, men samtidig lav RSD (<20 %). Dette anga høy presisjon og tilsa at det kan utføres relativt få analyser av samme prøve uten betydelig påvirkning av nøyaktigheten [2]. RSD ble derfor vektlagt ved vurdering av hvilke nivå som var innenfor grensene for presisjon og nøyaktighet.

Konsekvent lav nøyaktighet kunne skyldes systematiske feil på ett eller flere trinn i analyseprosessen, for eksempel ved tillaging av standarder og kontroller, men sammenligning med mellom serie variasjon tydet likevel på at dette ikke var tilfellet. Siden stoffene representerte samtlige konsentrasjonsgrupper i arbeidsløsningen, var også feil utpipettering av standarder eller kontroller en mindre sannsynlig årsak. Instrumentelle feil under analysen var imidlertid en mulig årsak. Lav RSD tydet på lav variasjon, og nøyaktigheten beregnet for mellom serie variasjon (**Tabell 4.11**) var en bekreftelse på at metoden kunne oppnå god nøyaktighet, selv mellom separate analyser. Variasjon innen serie kunne derfor med fordel vært testet på nytt.

Reproduserbarhet og nøyaktighet (mellom serie variasjon)

Presisjon og nøyaktighet mellom serie er presentert i **Tabell 4.11** sammen med teoretiske og målte konsentrasjoner. Variasjon mellom serie dannet grunnlag for å konkludere MKK, med de gitte grensene på 20 % og ± 20 % for henholdsvis presisjon og nøyaktighet. For enkelte stoffer ble MKK satt høyere enn konsentrasjonen til Kontroll 2. Disse tallene er bleket (med grå skrift) i tabellen. Kontroll 3 ble satt som MKK for 5-IT fordi Kontroll 2 hadde et betraktelig høyere nivå av kromatografisk støy og dermed lavt S/N-forhold.

Tabell 4.11: Reproduserbarhet (teoretiske og målte konsentrasjoner er oppgitt som μM)

		Kontroll 2 n=2×7	Kontroll 3 n=2×7	Kontroll 4 n=2×7	Kontroll 5 n=2×7	Kontroll 6 n=2×7
MDAI	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,24	0,48	0,73	0,98	1,4
	RSD	15 %	11 %	10 %	10 %	16 %
	Nøyaktighet	96 %	97 %	97 %	98 %	111 %
Metylon	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,25	0,46	0,70	0,97	1,4
	RSD	20 %	12 %	7 %	13 %	15 %
	Nøyaktighet	102 %	92 %	94 %	97 %	112 %
5-IT	Teoretisk	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5
	Målt	2,4	4,1	6,7	10,0	12,0
	RSD	36 %	40 %	34 %	17 %	15 %
	Nøyaktighet	95 %	82 %	89 %	100 %	96 %
PFA	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,27	0,48	0,72	0,95	1,4
	RSD	16 %	7 %	11 %	6 %	17 %
	Nøyaktighet	108 %	97 %	96 %	95 %	108 %

Alfa-metyltryptamin	Teoretisk	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5
	Målt	2,4	4,6	7,5	9,9	12,9
	RSD	25 %	20 %	12 %	13 %	18 %
	Nøyaktighet	96 %	93 %	100 %	99 %	104 %
mCPP	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,30	0,47	0,70	0,90	1,4
	RSD	23 %	8 %	10 %	11 %	16 %
	Nøyaktighet	118 %	94 %	93 %	93 %	109 %
6-APB	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,26	0,46	0,69	0,90	1,4
	RSD	11 %	6 %	6 %	6 %	15 %
	Nøyaktighet	102 %	92 %	93 %	94 %	110 %
Pentedron	Teoretisk	0,13	0,25	0,38	0,50	0,63
	Målt	0,14	0,24	0,35	0,50	0,64
	RSD	9 %	9 %	7 %	6 %	8 %
	Nøyaktighet	110 %	98 %	94 %	100 %	102 %
Metoksetamin	Teoretisk	0,13	0,25	0,38	0,50	0,63
	Målt	0,15	0,24	0,34	0,47	0,68
	RSD	25 %	9 %	9 %	8 %	14 %
	Nøyaktighet	117 %	94 %	89 %	94 %	109 %
MDPV	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,32	0,54	0,75	1,0	1,2
	RSD	21 %	11 %	6 %	5 %	8 %
	Nøyaktighet	128 %	108 %	100 %	100 %	99 %
Etylfenidat	Teoretisk	0,13	0,25	0,38	0,50	0,63
	Målt	0,16	0,25	0,37	0,50	0,69
	RSD	22 %	7 %	7 %	7 %	15 %
	Nøyaktighet	124 %	101 %	99 %	99 %	111 %
2C-E	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,25	0,45	0,73	1,0	1,3
	RSD	21 %	9 %	6 %	7 %	7 %
	Nøyaktighet	99 %	91 %	97 %	100 %	105 %
Bromo DragonFLY	Teoretisk	0,25	0,50	0,75	1,0	1,3
	Målt	0,29	0,55	0,77	1,0	1,4
	RSD	27 %	19 %	12 %	10 %	11 %
	Nøyaktighet	115 %	109 %	102 %	103 %	107 %
AH-7921	Teoretisk	0,13	0,25	0,38	0,50	0,63
	Målt	0,15	0,24	0,36	0,49	0,62
	RSD	26 %	13 %	13 %	10 %	16 %
	Nøyaktighet	121 %	97 %	95 %	98 %	100 %

Det var lav variasjon mellom serie: reproduserbarhet på under 20 % og nøyaktighet mellom 89-112 % for samtlige stoffer, med unntak av 5-IT. God nøyaktighet indikerte akseptable verdier for samtlige valideringsparametere [2].

Resultater fra valideringen viste noe bedre repeterbarhet enn reproducerbarhet dersom man ser bort fra den generelt lave nøyaktigheten for innen serie variasjon. Repeterbarheten er vanligvis mindre preget av spredning sammenlignet med reproducerbarheten. Dette skyldes at analyser som utføres over flere serier og over en lengre tidsperiode er mer utsatt for spredning enn analyser som utføres på én serie og over kortere tid.

4.2.4 Minste detekterbare konsentrasjon (MDK)

MDK angir laveste stoffkonsentrasjon som kan påvises med sikkerhet av en gitt analysemetode. Forholdet mellom signal og støy (S/N) beregnes, og MDK settes ved en verdi på 3 eller høyere [2].

Det ble ekstrahert en fortynningsrekke i området 0,0025-0,050 μM . På tross av høy fortynningsgrad oppnådde flere av stoffene tydelige kromatografiske topper med lav bakgrunn/støy og høyt S/N-forhold, selv for de laveste konsentrasjonene og med 250 μl som mottakervolum. Resultatet for begge volumene er oppsummert i **Tabell 4.12**.

Tabell 4.12: Minste detekterbare konsentrasjon (MDK) med 50 og 250 μl mottakerløsning

Stoffnavn	Molar masse g/mol	MDK (50 μl) μM	MDK (250 μl) μM
MDAI	177,2	0,025	0,050
Metylon	207,2	0,0050	0,010
5-IT	174,2	0,25	0,50
PFA	153,2	0,0025	0,025
Alfa-metyltryptamin	174,2	0,25	0,50
mCPP	196,7	0,0025	0,010
6-APB	175,2	0,0025	0,0034
Pentedron	191,3	0,0025	0,0050
Metoksetamin	247,3	0,0025	0,0025
MDPV	275,3	0,0025	0,0025
Etylfenidat	247,3	0,0025	0,0025
2C-E	209,3	0,010	0,025
Bromo DragonFLY	294,1	0,025	0,050
AH-7921	329,3	0,0025	0,0050

Det ble konkludert med at 250 μl skulle benyttes videre som mottakervolum. MDK for dette volumet lå i området 0,0025-0,50 μM for samtlige stoffer.

Lavere MDK ble oppnådd med 50 µl som mottakervolum og skyldtes oppkonsentreringen og dermed mer stoff tilgjengelig for deteksjon.

Tabell 4.12 viser at MDK for 250 µl var lik laveste konsentrasjon som ble testet for metoksetamin, MDPV og etylfenidat. Kromatogrammene for de nevnte stoffene ga kromatografiske topper for laveste konsentrasjon (0,0025 µM), uavhengig av mottakervolumet. Det er derfor sannsynlig at de nevnte stoffene vil kunne oppnå enda lavere MDK, men dette ble ikke undersøkt.

4.2.5 Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK)

MKK angir laveste stoffkonsentrasjon som kan bestemmes med akseptabel presisjon av en gitt analysemetode. Det er vanlig å bruke et S/N-forhold på 10 som kvantifiseringsgrense [2]. Presisjon og nøyaktighet bør i tillegg være innenfor $\pm 20\%$ [55].

Tabell 4.13 presenterer MKK for samtlige stoffer, samt RSD, nøyaktighet og S/N-forhold.

Tabell 4.13: Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK)

Stoffnavn	MKK µM	RSD	Nøyaktighet	S/N
MDAI	0,25	15 %	96 %	117
Metylon	0,25	20 %	102 %	359
5-IT	5,0	40 %	82 %	49
PFA	0,25	16 %	108 %	191
Alfa-metyltryptamin	5,0	20 %	93 %	230
mCPP	0,50	8 %	94 %	1720
6-APB	0,25	11 %	102 %	1244
Pentedron	0,13	9 %	110 %	407
Metoksetamin	0,25	9 %	94 %	2680
MDPV	0,50	11 %	108 %	1321
Etylfenidat	0,25	6 %	101 %	24975
2C-E	0,50	9 %	91 %	334
Bromo DragonFLY	0,50	19 %	109 %	348
AH-7921	0,25	13 %	97 %	1579

MKK var i området 0,13-5,0 µM for samtlige stoffer. 5-IT og alfa-metyltryptamin hadde de klart høyeste kvantifiseringsgrensene. Området for MKK var forholdsvis høyt sammenlignet med tidligere publiserte kvantifiseringsgrenser som har blitt bestemt etter prøveopparbeidelse med samme teknikk [22]. Dette skyldes til en viss grad at det ble tatt større hensyn til

grensene for presisjon og nøyaktighet ($\pm 20\%$) ved MKK enn S/N-forholdet som var relativt høyt for de fleste stoffene, men også at fullblod ble benyttet som analysemedium. Lavere MKK kunne blitt bestemt dersom det kun hadde blitt brukt en S/N-grense på 10 til å konkludere. Dette ville imidlertid gått på bekostning av presisjonen for de laveste konsentrasjonene. God presisjon ble vektet tyngre med hensyn på metodens mulighet for kvantitativ anvendelse. Flere stoffer lå nær grensen på $\pm 20\%$, det er derfor også mulig at analyse av flere serier kunne endret resultatet og ført til noe lavere MKK.

MKK (og MDK) ble bestemt med 250 μl som mottakervolum, altså ingen oppkonsentrering. Argumentet for dette var den nevnte hensikten om å muliggjøre effektivisering ved bruk av multikanalpipette som krever et høyere mottakervolum enn 50 μl . Det er sannsynlig at lavere MKK kunne blitt oppnådd med et større volumforhold mellom prøve- og mottakerløsning. Økning i volumforhold kan også oppnås med høyere volum av prøveløsningen. For PVDF-membraner er imidlertid ulike prøveløsninger undersøkt, og en grense på 250 μl anbefales [22]. Volumet av brønnene i bunnplaten vil også sette en naturlig grense for maksimal mengde prøveløsning.

Tidligere kvantifiseringer

Ideell MKK bestemmes til en viss grad av tidligere kvantifiseringer av de aktuelle stoffene, og den bør være lavere eller lik maks plasmakonsentrasjon (C_{max}) som det er vanlig å oppnå ved inntak av stoffene. Slik informasjon foreligger ikke for alle testsubstansene, men noe data er publisert i forbindelse med kjente dødsfall og obduksjonsanalyser.

MDPV er et av de mest omtalte stoffene, og informasjon om målte konsentrasjoner foreligger for både obduksjonsblod og blod fra levende personer. Blodprøver fra bilførere som har kjørt i påvirket tilstand er blant annet kvantifisert med konsentrasjoner fra 0,060-29 μM [58]. Obduksjonsanalyser har vist MDPV-konsentrasjoner på blant annet 2,5 μM i hjerteblod og 3,6 μM i perifert blod [59]. 5-IT har nylig ført til dødsfall i Sverige, og obduksjonsanalyser av blod fra lårvenen har påvist konsentrasjoner på mellom 4,00-107 μM [60]. mCPP har også ført til dødsfall, og er blant annet kvantifisert med en plasmakonsentrasjon på 1515 μM 3-4 timer etter inntak [61].

Enkelte av de publiserte konsentrasjonene var høyere enn høyeste standard i oppgaven. Hvis metoden i denne oppgaven skulle blitt brukt til screening ville resultatene gått ut som positive,

men ved kvantifisering ville fortynning vært nødvendig. Konsentrasjonene som var lavere enn stoffenes kvantifiseringsgrenser viste at metoden ikke var sensitiv nok for disse. Mengden blod som benyttes til analyse må imidlertid tas med i betraktningen. En større mengde blod vil teoretisk kunne gi lavere kvantifiseringsgrense fordi mer stoff er tilgjengelig for ekstraksjon og analyse. Oppgavens metode bruker et relativt lite blodvolum (100 µl). Dette vil være et konkurransedyktig moment i en eventuell sammenligning med andre metoder som krever større mengder fordi det er ugunstig å være avhengig av større mengder blod for å kunne utføre en analyse, det kan nemlig være problematisk å få nok medium til analyse.

4.2.6 Retensjonstidsstabilitet for internstandarder

Resultatet for retensjonstidsstabiliteten til internstandarder er presentert i **Tabell 4.14**.

Tabell 4.14: Gjennomsnittlig retensjonstid (n=6), område (min/maks) og RSD for internstandarder

Internstandard	Gjennomsnittlig retensjonstid (min.) (n=6)	Område (min.)	RSD
¹³ C-MDA	3,91	3,87 – 3,94	1 %
¹³ C-MDEA	4,68	4,61 – 4,71	1 %
¹³ C-PMA	4,30	4,25 – 4,33	1 %
¹³ C-PMMA	4,46	4,41 – 4,49	1 %
¹³ C-2C-B	6,62	6,57 – 6,65	1 %

Gjennomsnittlig RSD på 1 % for samtlige internstandarder viste at spredningen var liten og at retensjonstiden var stabil. Området for retensjonstidene bekreftet det samme. Stabil retensjonstid for internstandardene kunne tyde på stabil retensjonstid også for analyttene.

4.2.7 Ekstraksjonsutbytte

Sammenlignet med valideringsparametere som MKK, MDK, presisjon og nøyaktighet ansees ikke ekstraksjonsutbytte som en like essensiell parameter i metodevalidering [54]. Ekstraksjonsutbyttet skal imidlertid alltid beregnes ved utvikling av nye ekstraksjonsmetoder fordi prøveopparbeidelsen som regel medfører et visst tap av analytt [2], noe det er viktig å ha kontroll på.

Ekstraksjonsutbyttet er presentert i **Tabell 4.15**. Tabellen viser gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte for tre økende konsentrasjonsnivå (n=10).

Tabell 4.15: Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte for tre økende konsentrasjonsnivå (n=10)

	Gjennomsnittlig utbytte		
	Kontroll 3 n=10	Kontroll 4 n=10	Kontroll 5 n=10
MDAI	11 %	16 %	21 %
Metylon	31 %	40 %	46 %
5-IT	9 %	9 %	16 %
PFA	40 %	49 %	55 %
Alfa-metyltryptamin	8 %	11 %	19 %
mCPP	66 %	65 %	69 %
6-APB	38 %	47 %	58 %
Pentedron	83 %	83 %	85 %
Metoksetamin	86 %	85 %	87 %
MDPV	54 %	65 %	71 %
Etylfenidat	63 %	67 %	69 %
2C-E	3 %	7 %	13 %
Bromo DragonFLY	38 %	43 %	55 %
AH-7921	32 %	47 %	59 %

Ekstraksjonsutbyttet for de tre kontrollene var i området 3-87 %. Lavest ekstraksjonsutbytte ble beregnet for 2C-E (3-13 %). Til sammenligning ble det oppnådd et ekstraksjonsutbytte på rundt 30 % fra vandige prøveløsninger. Ekstraksjonsutbyttet fra vandige prøveløsninger ble imidlertid beregnet med utgangsløsninger som var fortynnet direkte med mottakerløsning (avsnitt 3.8.1). Ekstraksjonsutbyttet fra biologiske prøveløsninger ble beregnet fra mer reelle utgangsløsninger (avsnitt 3.9.8). Dette kan ha bidratt til et mer nøyaktig beregnet ekstraksjonsutbytte for de biologiske prøveløsningene, men et lavere ekstraksjonsutbytte for disse kan også skyldes at stoffene lettere ekstraheres fra vandige løsninger enn fra biologiske løsninger, i så fall med proteinbinding som sannsynlig årsak.

Konsentrasjonsavhengig ekstraksjonsutbytte er tidligere observert på grunn av uspesifikk binding til membranen dersom det benyttes membranfiltre av PVDF [22]. Ekstraksjonsutbyttet for 5-IT, mCPP, pentedron og metoksetamin var imidlertid lite avhengig av konsentrasjon (**Vedlegg 1**). Ekstraksjonsutbyttet for etylfenidat var også forholdsvis uavhengig av konsentrasjon med en stigning på kun 6 % fra laveste til høyeste kontroll (63-69 %). AH-7921 viste høyeste konsentrasjonsavhengighet, med en nær fordobling fra laveste til høyeste kontroll (32-59 %). Et konsentrasjonsavhengig ekstraksjonsutbytte er ikke gunstig ved kvantitativ bestemmelse, men er ikke nødvendigvis utslagsgivende dersom konsentrasjonsavhengigheten er relativt lav.

4.2.8 Matrikseffekter

LC-MS/MS er som nevnt særskilt utsatt for matrikseffekter. Evaluering av matrikseffekter er derfor en viktig del av metodevalideringen for nye LC-MS/MS-metoder. Matrikseffekter kan evalueres på ulike måter, blant annet med teknikken post-kolonnieinfusjon [62]. I denne oppgaven ble imidlertid Matuszewskis metode benyttet [3].

Absolutte og relative matrikseffekter ble beregnet, og resultatet er presentert i **Tabell 4.16**. Absolutte matrikseffekter (ME) skal helst være innenfor en grense på 80-120 % [55]. Verdier over og under 100 % angir henholdsvis forsterket og undertrykket ioneintensitet [3].

Tabell 4.16: Absolutte (ME) og relative matrikseffekter (RSD)

	Absolutte og relative matrikseffekter			
	Kontroll 3 (n=6)		Kontroll 5 (n=6)	
	ME	RSD	ME	RSD
MDAI	100 %	4 %	104 %	3 %
Metylon	101 %	6 %	100 %	4 %
5-IT	83 %	50 %	98 %	8 %
PFA	102 %	3 %	106 %	3 %
Alfa-metyltryptamin	98 %	10 %	107 %	4 %
mCPP	104 %	6 %	100 %	4 %
6-APB	101 %	3 %	105 %	2 %
Pentedron	102 %	4 %	104 %	2 %
Metoksetamin	103 %	3 %	104 %	2 %
MDPV	101 %	4 %	105 %	2 %
Etylfenidat	103 %	3 %	106 %	2 %
2C-E	102 %	3 %	104 %	2 %
Bromo DragonFLY	105 %	5 %	107 %	3 %
AH-7921	103 %	2 %	104 %	2 %

ME på mellom 98-107 % ble oppnådd, med unntak av for laveste kontroll for 5-IT som ga ME på 83 %. Høyeste nivå for samme stoff viste til sammenligning ME på 98 %, men fordi 5-IT viste generelt stor variasjon var det nærliggende å tolke også dette resultatet som en tilfeldighet.

Samtlige ME var innenfor grensen på ± 20 % (80-120 %). Dette er svært gunstig ved en kvantitativ anvendelse av metoden, og analyttene vil ikke være like avhengig av responsen til en internstandard for å oppnå tilfredsstillende kvantifisering.

Relativ matrikseffekt (RSD) var lav for samtlige stoffer (<6 %), med unntak av for 5-IT og laveste kontroll for alfa-metyltryptamin. Lav RSD regnes som positivt for LC-MS/MS-metoders selektivitet [55].

4.2.9 Spesifisitet

Spesifisitet er metodens evne til å detektere og analysere de stoffene som skal analyseres, uten å la seg påvirke av andre stoffer som er til stede i prøven. I biologiske analyser stammer ofte slike interferenser fra det biologiske mediet [2], for eksempel fosfolipider. Muligheten for falske positive prøver på grunn av mulig tilstedeværende rus- og/eller legemidler i prøvene kan også være tilfelle og bør av den grunn evalueres.

Et falskt positivt resultat ble definert som en kromatografisk topp med riktig retensjonstid og en verdi over laveste valideringsstandard.

I kromatogrammet for etylfenidat ble det observert en topp med lik m/z og retensjonstid som den ene overgangen til etylfenidat (248,2>84,1). Signalet var mest tydelig i prøven som var tilsatt internstandard. Den aktuelle overgangen ble benyttet til kvantifisering i MassLynx. Signalet ble tilregnet en konsentrasjon på 0,0040 μM . Dette utgjorde 16 % av laveste standard (0,025 μM) og 1,6 % av MKK (0,25 μM). Av den grunn er en potensiell overestimering lite sannsynlig, med mindre etylfenidat blir forsøkt kvantifisert i en prøve med lavere konsentrasjon enn MKK, og hvor også stoffet med lik m/z og retensjonstid er til stede. Metoden var dermed spesifikk. Dersom svarene bidrar til negative sanksjoner skal prøven bekreftes positiv med en annen metode før resultatet sendes.

Blindprøver

Blindprøvene som ble prøveopparbeidet og analysert i samtlige serier ble også benyttet til å vurdere metodens spesifisitet. Dersom kromatografiske topper hadde blitt observert ville det tyde på interferens fra allerede foreliggende matrikskomponenter eller komponenter tilkommet underveis i analyseprosessen. Negative blindprøver ble derimot tolket som en bekreftelse på at interfererende substanser ikke var til stede i høy nok konsentrasjon til å bli detektert. Dette var gjennomgående tilfellet; blindprøvene hadde aldri andre topper enn støy, bortsett fra ved det ene tilfellet av overdrag i PALME-oppsettet som er nevnt i avsnitt 4.1.6.

4.2.10 Overdrag i LC-MS/MS

Overdrag under analysen ble undersøkt og kromatogrammene for blindprøvene som ble injisert etter den høykonsentrerte prøven var enten uten topper, eller så var toppene så lave at målt konsentrasjon ble beregnet som prosentandel av MKK (Tabell 4.17).

Tabell 4.17: Overdrag i forhold til MKK

	MKK μM	Blindprøve 1		Blindprøve 2	
		μM	Overdrag	μM	Overdrag
MDAI	0,25	-	-	-	-
Metylon	0,25	-	-	-	-
5-IT	5,0	0,16	3 %	-	-
PFA	0,25	-	-	-	-
Alfa-metyltryptamin	5,0	0,54	11 %	-	-
mCPP	0,50	-	-	-	-
6-APB	0,25	0,014	6 %	-	-
Pentedron	0,13	-	-	-	-
Metoksetamin	0,25	0,0040	2 %	0,0040	2 %
MDPV	0,50	0,012	2 %	-	-
Etylfenidat	0,25	0,0040	2 %	0,0030	1 %
2C-E	0,50	0,29	57 %	-	-
Bromo DragonFLY	0,50	0,083	17 %	-	-
AH-7921	0,25	0,020	8 %	0,017	7 %

Analyse av konsentrasjoner opp til 10 ganger høyeste standard kan analyseres uten overdrag for de fleste stoffer, men ved analyse av stoffer med en konsentrasjon over 10 ganger høyeste standard vil 2C-E og til dels Bromo DragonFLY og alfa-metyltryptamin kunne få falske positive resultat med konsentrasjoner rundt MKK som vil ha innvirkning på påvisning og det kvantitative resultatet. Ved høye konsentrasjoner av 2C-E bør derfor en ny injeksjon av påfølgende prøver vurderes. Dette vil alltid vurderes ved rutineanalyse. Ved analyse av prøver fra forgiftningsspasienter, der høye verdier kan forventes, kan eventuelt blanke prøver injiseres 1-2 ganger etter hver reelle prøve.

4.2.11 Holdbarhet

Rus- og legemidler i biologiske prøver har ofte lav holdbarhet på grunn av ofte kort halveringstid ($t_{1/2}$) og den komplekse matriksen som inneholder enzymer som bidrar til stoffenes nedbrytning [8]. Det samme kan gjelde for stoffer i ekstrakter. Dette er en del av årsaken til at det utføres prøveoppbevaring. Holdbarheten i ekstrakter er ikke kjent, og må undersøkes.

Holdbarheten i ekstraktene er presentert som prosentavvik fra opprinnelig målt konsentrasjon og er presentert i **Tabell 4.18**.

Tabell 4.18: Avvik fra opprinnelig målt konsentrasjon etter oppbevaring ved 10 og -20 °C i opp til syv dager

	Avvik fra opprinnelig konsentrasjon								
	1 dag i autosampler (10°C)			7 dager i autosampler (10°C)			7 dager i fryser (-20°C)		
	K2	K4	K6	K2	K4	K6	K2	K4	K6
MDAI	-20 %	14 %	-2 %	11 %	2 %	-8 %	9 %	7 %	7 %
Metylon	-2 %	6 %	2 %	16 %	-3 %	-9 %	3 %	-14 %	-3 %
5-IT	42 %	-6 %	-1 %	36 %	-10 %	-18 %	-	-	-
PFA	-8 %	-4 %	3 %	-24 %	-10 %	-1 %	5 %	2 %	5 %
Alfa-metyltryptamin	38 %	23 %	-10 %	15 %	8 %	2 %	-2 %	16 %	2 %
mCPP	-21 %	-6 %	-6 %	-10 %	-4 %	-6 %	-11 %	4 %	11 %
6-APB	-12 %	3 %	-5 %	7 %	0 %	1 %	1 %	3 %	7 %
Pentedron	4 %	0 %	-7 %	-17 %	-13 %	-13 %	-7 %	-8 %	2 %
Metoksetamin	-16 %	-2 %	-3 %	-4 %	-4 %	-5 %	0 %	7 %	2 %
MDPV	8 %	1 %	4 %	-8 %	-15 %	-12 %	0 %	-2 %	-2 %
Etylfenidat	-15 %	2 %	-2 %	-11 %	-9 %	-10 %	2 %	2 %	4 %
2C-E	4 %	-21 %	17 %	-4 %	-6 %	-3 %	13 %	-5 %	5 %
Bromo DragonFLY	-28 %	-1 %	-5 %	-15 %	19 %	-1 %	28 %	-10 %	-19 %
AH-7921	4 %	11 %	6 %	-25 %	-19 %	-17 %	6 %	3 %	2 %

Tallene for avvikene etter én dag i autosampler er egentlig overflødige ettersom syv dagers holdbarhet med like betingelser var god for samtlige stoffer. De relativt små avvikene (mellom -24-19 %, med unntak av laveste kontroll for 5-IT) kan like gjerne være et resultat av instrumentell variasjon enn et faktisk avvik. Holdbarheten etter syv dager i fryser var også god, med unntak av for 5-IT som så ut til å forsvinne. Ved FHI benyttes vanligvis en avviksgrense på ± 30 %. Samtlige stoffer, unntatt 5-IT, var innenfor denne grensen.

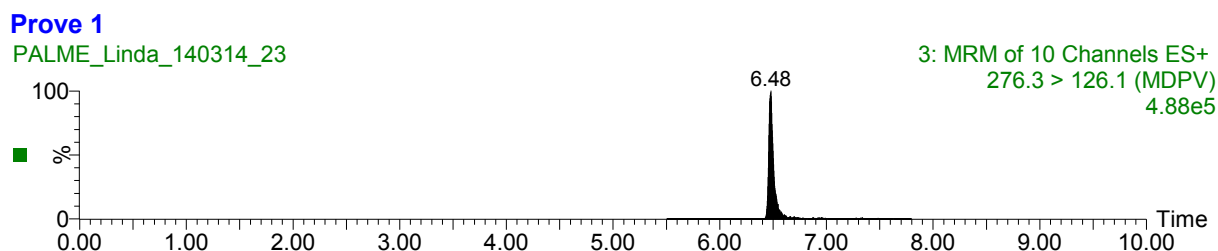
4.3 Autentiske prøver

Som nevnt under avsnitt 3.5 var ikke alle stoffene tilgjengelige i autentiske prøver, til tross for at det ble rekvirert prøver fra en biobank som lagrer prøver fra 10 år tilbake i tid. Dette kan bety at stoffene enten ikke ble brukt for flere år siden, og/eller at instituttet ikke har detektert dem tidligere på grunn av manglende kjennskap til stoffene og manglende referansesubstans. Dersom noen av prøvene skulle inneholdt et stoff, men denne siste analysen ikke påviste det, var antagelig langvarig holdbarhet for aktuelt stoff i blod dårlig.

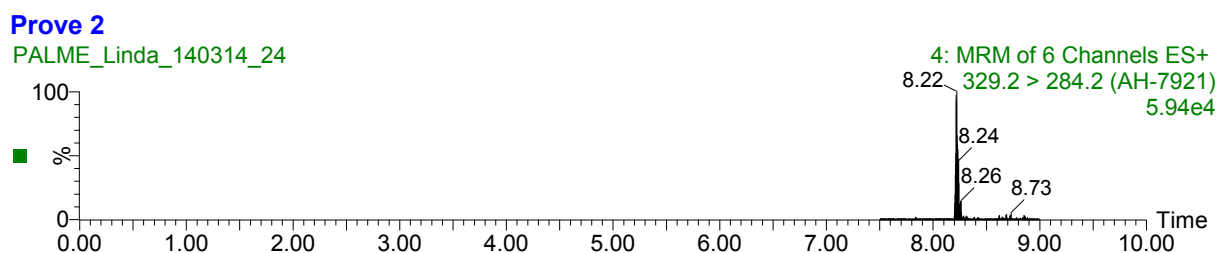
Totalt ble det analysert 10 autentiske prøver. Flesteparten bestod av blod som opprinnelig var fra levende personer. Enkelte prøver var fra tidligere obduksjonssaker og bestod av obduksjonsblod, postmortalt blod.

Deteksjon

Ekstraksjon ble utført som beskrevet under metodedelens avsnitt 3.7.3. Ved endt analyse ble kromatogrammene undersøkt for topper med sammenfallende m/z og retensjonstid som metodens testsubstanser. **Figur 23-32** viser kromatogrammene for prøvene.



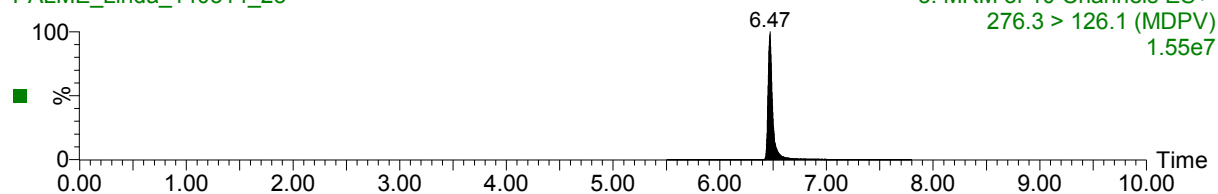
Figur 23: Kromatogram for prøve 1 (MDPV)



Figur 24: Kromatogram for prøve 2 (AH-7921)

Prove 3

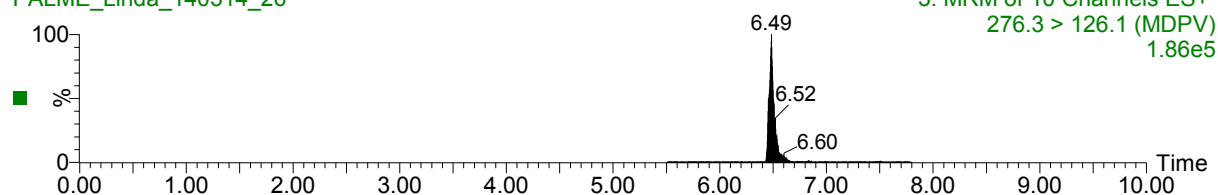
PALME_Linda_140314_25



Figur 25: Kromatogram for prøve 3 (MDPV)

Prove 4

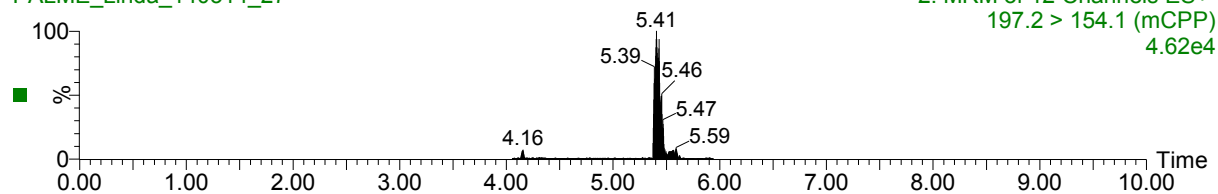
PALME_Linda_140314_26



Figur 26: Kromatogram for prøve 4 (MDPV)

Prove 5

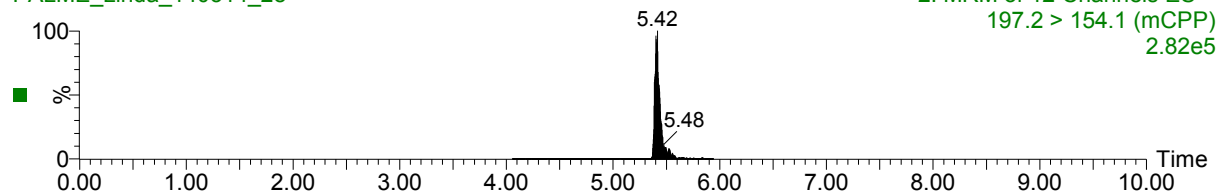
PALME_Linda_140314_27



Figur 27: Kromatogram for prøve 5 (mCPP)

Prove 6

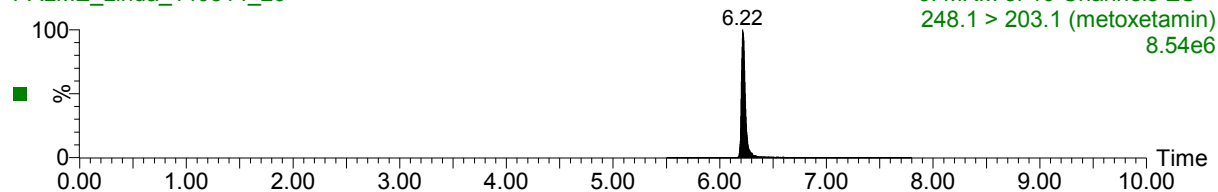
PALME_Linda_140314_28



Figur 28: Kromatogram for prøve 6 (mCPP)

Prove 7

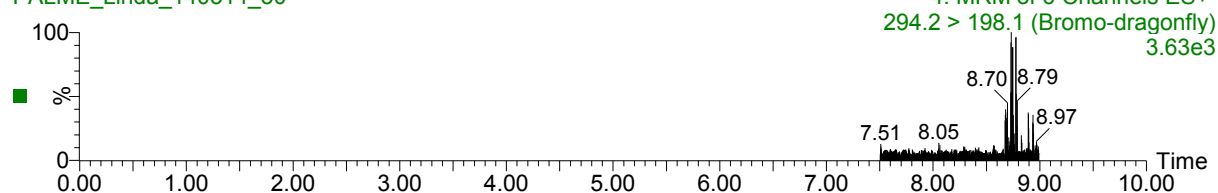
PALME_Linda_140314_29



Figur 29: Kromatogram for prøve 7 (metoksetamin)

Prove 8

PALME_Linda_140314_30

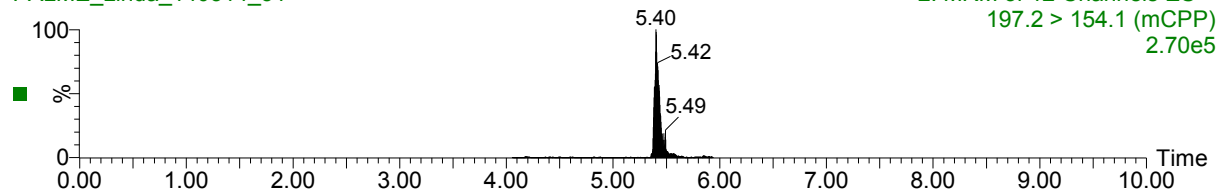


Figur 30: Kromatogram for prøve 8 (Bromo DragonFLY)

Kromatogrammet for Bromo DragonFLY viste ikke signal for stoffet, kun et lavt signal ved feil retensjonstid.

Prove 9

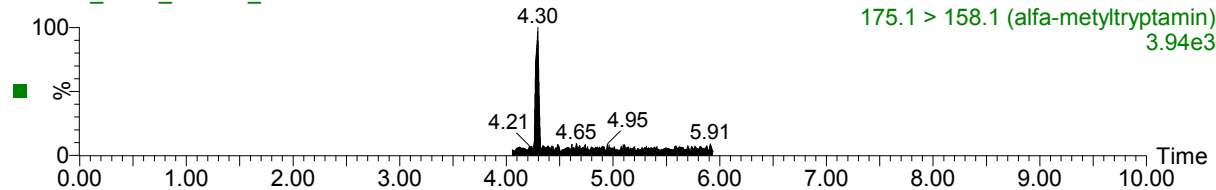
PALME_Linda_140314_31



Figur 31: Kromatogram for prøve 9 (mCPP)

Prove 10

PALME_Linda_140314_32



Figur 32: Kromatogram for prøve 10 (alfa-metyltryptamin)

Kvantitativ bestemmelse

Prøvene var som nevnt oppbevart dypfrys ved FHI, noen i opp til 10 år. Fordi stabiliteten og holdbarheten til stoffene i prøvene er forholdsvis ukjent vil dette være en mulig feilkilde ved kvantitativ reanalysering av prøvene.

Konsentrasjonen i de autentiske prøvene ble beregnet ved å analysere en standardrekke i samme serie. Resultatet er presentert i **Tabell 4.19**.

Tabell 4.19: Kvantitativ bestemmelse av autentiske prøver

Prøve	Innhold	Standardområde	Målt konsentrasjon ved PALME (µM)	Tidligere målt konsentrasjon (µM)	Avvik (%)
1	MDPV	0,50 - 1,5	0,60	0,40**	50 %
2	AH-7921	0,25 - 0,75	0,040	1,3*	-97 %
3	MDPV	0,50 - 1,5	4,5	3,0*	53 %
4	MDPV	0,50 - 1,5	0,20	0,16**	25 %
5	mCPP	0,50 - 1,5	0,10	0,30**	-67 %
6	mCPP	0,50 - 1,5	0,30	0,24**	25 %
7	Metoksetamin	0,25 - 0,75	1,2	0,88*	31 %
8	Bromo DragonFLY	0,50 - 1,5	Ikke detektert	1,1	-
9	mCPP	0,50 - 1,5	0,33	0,57	-42 %
10	Alfa-metyltryptamin	5,0 - 15	7,4	6,4	16 %

* = konsentrasjon utenfor standardkurven, ** = konsentrasjon lavere enn MKK

FHI godtar i sin rutine en forskjell på opptil 30 % mellom analyseresultater for samme stoff med to forskjellige metoder. Muligheten for større avvik for prøver som har vært frosset og tint, eventuelt oppbevart lenge i fryser med en påfølgende potensiell nedbrytning av innholdet i prøvene må likevel vurderes.

Målingene for prøve 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9 og 10 ble vurdert som tilfredsstillende, og avvikene kunne like gjerne skyldes analytisk variasjon og at enkelte konsentrasjoner var utenfor standardområdet eller lavere enn MKK. I tillegg var den lange oppbevaringstiden en mulig avvikskilde.

Konsentrasjonen til prøve 3, 7 og 9 ble beregnet uten internstandard fordi signalet for internstandard var eksepsjonelt lavt i disse prøvene, og førte til overestimering av konsentrasjonen i prøvene. To av disse prøvene inneholdt obduksjonsblod. Obduksjonsblod forårsaker ofte matrikseffekter på grunn av interfererende matrikskomponenter. Dette kan være årsak til det lave signalet for internstandard (ioneundertrykkelse).

Med unntak av AH-7921 og Bromo DragonFly som så ut til å ha helt eller delvis forsvunnet fra prøvene var alle de målte konsentrasjonene av samme størrelsesorden som tidligere analyse, og forskjellen ville ikke nødvendigvis ført til noen forskjell i fortolkning av resultatet. For å likevel eliminere den lange oppbevaringstiden som potensiell avvikskilde kunne prøvene blitt reanalysert med samme metode som ble benyttet ved første analyse, men dette lå ikke innenfor oppgavens rammer. PALME kan på grunnlag av dette forsøket benyttes til prøveoppbevaring av NPS fra fullblod med en påfølgende screening av denne typen stoffer.

5 Avsluttende bemerkninger

Oppgaven ble avsluttet med en del gjenstående forsøk til gode. Disse kunne det vært interessant å utføre blant annet for å undersøke enkelte parametere mer grundig. De fleste er foreslått og diskutert underveis i oppgaven, men blir oppsummert her avslutningsvis for å klargjøre hva som eventuelt kan gjøres videre.

Optimalisering med biologiske prøveløsninger fremfor vandige prøveløsninger

Med et helhetlig blikk på oppgaven er det naturlig å påpeke at optimalisering av ekstraksjonen i større grad burde vært utført med biologiske prøveløsninger fremfor vandige. Det var naturlig å utføre et første forsøk med vandige prøveløsninger for å vurdere om stoffene ble ekstrahert med PALME, men mindre tid burde blitt brukt på å etablere ekstraksjonsbetingelser for disse løsningene. Valg av internstandard og volum av organisk væskemembran kunne med fordel blitt tatt på grunnlag av ekstraksjon fra en biologisk prøveløsning, som i mye større grad representerte reelle forhold.

Bruk av egne isotopmerkede internstandarder for å redusere variasjon

Stoffene med høyest variasjon, 5-IT og alfa-metyltryptamin, burde blitt undersøkt med sine egne isotopmerkede internstandarder for å vurdere om det ville bidratt til lavere RSD.

Standardkurvenes konsentrasjonsområde

Standardkurvene ble satt opp med et forholdsvis smalt konsentrasjonsområde. Konsentrasjonen i enkelte autentiske prøver var ikke innenfor dette området. I tillegg er høyeste standard for gruppe I i arbeidsløsningen lavere enn konsentrasjonen som ble brukt til å optimalisere membranvolum (0,90 μM) og basetilsetning (1,0 μM), og høyeste standard for både gruppe I og II er lavere enn konsentrasjonen som ble brukt til å optimalisere ekstraksjonstid (2,0 μM).

Tilsetning av trioktylamin til organisk væskemembran ved ekstraksjon fra blod

Beregning av ekstraksjonsutbyttet for vandige prøveløsninger viste en tydelig økning dersom 2 % trioktylamin ble tilsatt til den organiske membranen. Dette burde også undersøkes for biologiske prøveløsninger ettersom enkelte stoffer, spesielt 2C-E, oppnådde et betraktelig lavere ekstraksjonsutbytte ved ekstraksjon fra blod.

MDK og MKK

MDK kunne blitt undersøkt med enda lavere konsentrasjoner ettersom flere av stoffene hadde høy signalintensitet og høyt S/N-forhold, selv for laveste konsentrasjon.

MKK kunne blitt undersøkt med 50 µl mottakerløsning, for å studere om oppkonsentrering hadde gitt lavere MKK. Dette ville i større grad vært et *proof of principle*, og et forsøk på å oppnå best mulig resultat, i stedet for å tilrettelegge for rutinemessig anvendelse av metoden.

Bruk av multikanalpipette

Ettersom det likevel ble benyttet 250 µl som volum av mottakerløsning kunne det blitt utført et forsøk hvor ekstraktene ble overført til en ny bunnplate med en multikanalpipette (8-/96-kanalpipette) for å undersøke om analyseresultatene ble forskjellige.

Spesifisitetstest

Spesifisitetstesten kunne inkludert enda flere renstoffer for å ekskludere enda flere mulige interfererende stoffer.

Holdbarhet

Holdbarheten til stoffene i ekstraktene kunne blitt undersøkt også med andre oppbevaringsbetingelser, som for eksempel oppbevaring i romtemperatur. Det kunne også vært interessant å undersøke stoffenes holdbarhet i blod med tanke på oppbevaring før analyse eller ved behov for reanalyse på et senere tidspunkt.

Metodens kvantitative anvendelse

For å få et bedre sammenligningsgrunnlag kunne de autentiske prøvene blitt reanalysert med opprinnelig metode, samtidig med denne nye, og sammenlignet på nytt.

Polypropylen til inkorporering av organisk væskemembran

Dersom mottakerplater med filter av polypropylen blir kommersielt tilgjengelige ville det vært interessant å undersøke om polypropylen bidrar til mindre variasjon i analyseresultatene.

6 Konklusjon

I denne oppgaven ble mikroekstraksjonsteknikken PALME anvendt til prøveopparbeidelse av et utvalg substanser fra stoffgruppen NPS, med fullblod som analysemedium for første gang. Ekstraktene ble analysert med UHPLC-MS/MS og ekstraksjonsbetingelsene ble optimalisert før det ble utført en validering av den endelige metoden. Avslutningsvis ble det ekstrahert og analysert 10 autentiske prøver for vurdering av metodens egnethet til kvantitativ analyse.

Optimalisering av betingelsene for ekstraksjonen ga følgende prosedyre som resultat:

Stoffene ble ekstrahert fra en 250 µl prøveløsning som bestod av 100 µl blodprøve, 75 µl 80 mM NaOH, 50 µl vann og 25 µl internstandard. Organisk væskemembran bestod av 3 µl dodecylacetat, og 20 mM HCOOH ga pH-drevet overgang til 250 µl mottakerløsning. Ekstraksjonen ble fremmet med risting ved 900 rpm og pågikk i 40 minutter.

96-brønnsformatet muliggjorde ekstraksjon av 96 prøver samtidig. Ytterligere effektivisering kunne blitt oppnådd ved å bruke en multikanalpipette (8- eller 96-kanalpipette) til å overføre ekstraktene fra mottakerplaten til en ny bunnplate som plasseres direkte i analyseinstrumentet.

PALME med de nevnte betingelsene kombinert med bruk av UHPLC-MS/MS til utførelse av raske blodprøveanalyser ble validert. Valideringen viste stort sett tilfredsstillende resultater for presisjon, nøyaktighet og spesifisitet. Standardkurvene hadde r^2 -verdier mellom 0,92 og 0,99. Forholdsvis lav r^2 , et visst konsentrasjonsavhengig ekstraksjonsutbytte og RSD over 20 % for de laveste konsentrasjonene reduserte metodens kvantitative anvendelse for enkelte stoffer. Kvantifiseringsgrenser ble satt mellom 0,13-5,0 µM. Svært lave matrikseffekter og lite bakgrunn/støy i kromatogrammene tydet på svært rene ekstrakter. Ekstraktene viste også god holdbarhet i opp til syv dager ved 10°C og -20°C. Deteksjonsgrenser ble satt mellom 0,0025-0,50 µM. Ved behov kan en økning i sensitivitet oppnås med en lavere mengde mottakerløsning. 14 stoffer og åtte internstandarder ble tilfredsstillende separert i løpet av en analysetid på 9 minutter.

Analysen av autentiske prøver viste noe avvik mellom gamle og nye resultater. Likevel ble alfa-metyltryptamin, mCPP, MDPV, metoksetamin og AH-7921 presist detektert i opp til 10 år gamle blodprøver, dessuten enkelte obduksjonsprøver. Tydelige topper og lav bakgrunn i

kromatogrammene bekreftet at kombinasjonen PALME-UHPLC-MS/MS egnet seg til å detektere NPS, selv fra et av de mest komplekse mediene innen biologisk analyse.

Oppsettet og betingelsene for PALME i denne oppgaven viste at metoden kunne brukes til en rask prøveoppbehandling for screening av NPS i blod. Den ga tilstrekkelig sensitivitet for forgiftningssaker og trolig også for mange påvirkningssaker. Videre optimalisering av betingelser og konsentrasjoner vil også kunne bidra til mulig bruk innen kvantifisering av rutineprøver. I tillegg bør videreutvikling av metoden utføres med mottakerplater hvor membranfiltrene består av polypropylen, forutsatt at disse blir kommersielt tilgjengelige. Disse platene har tidligere bidratt til gode resultater og det kan derfor tenkes at de også kan bedre denne oppgavens resultater.

Litteraturliste

1. Chiu, M.L., et al., *Matrix effects—a challenge toward automation of molecular analysis*. Journal of the Association for Laboratory Automation, 2010. **15**(3): p. 233-242.
2. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*. 2. ed. 2010, Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS.
3. Matuszewski, B., M. Constanzer, and C. Chavez-Eng, *Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(13): p. 3019-3030.
4. Taylor, P.J., *Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry*. Clinical biochemistry, 2005. **38**(4): p. 328-334.
5. Bonfiglio, R., et al., *The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1999. **13**(12): p. 1175-1185.
6. Zhang, C., *Fundamentals of Sample Preparation for Environmental Analysis*, in *Fundamentals of Environmental Sampling and Analysis*. 2007, Wiley. p. 159-189.
7. Kataoka, H., et al., *Handbook of Sample Preparation*. 2010, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA.
8. Nováková, L. and H. Vlčková, *A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation*. Analytica Chimica Acta, 2009. **656**(1): p. 8-35.
9. Chen, Y., et al., *Sample preparation*. Journal of Chromatography A, 2008. **1184**(1): p. 191-219.
10. Liu, H. and P.K. Dasgupta, *Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(11): p. 1817-1821.
11. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(14): p. 2650-2656.
12. Ho, T.S., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Experiences with carrier-mediated transport in liquid-phase microextraction*. Journal of chromatographic science, 2006. **44**(6): p. 308-316.

13. Ho, T.S., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions*. Analyst, 2002. **127**(5): p. 608-613.
14. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of acidic drugs*. Electrophoresis, 2000. **21**(3): p. 579-585.
15. Bjørhovde, A., et al., *Liquid-phase microextraction of drugs from human breast milk*. Analytica chimica acta, 2003. **491**(2): p. 155-161.
16. Grønhaug Halvorsen, T., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001. **760**(2): p. 219-226.
17. Rasmussen, K.E., et al., *Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2000. **873**(1): p. 3-11.
18. de Jager, L. and A.R. Andrews, *Development of a screening method for cocaine and cocaine metabolites in saliva using hollow fiber membrane solvent microextraction*. Analytica Chimica Acta, 2002. **458**(2): p. 311-320.
19. Sarafraz-Yazdi, A. and A. Amiri, *Liquid-phase microextraction*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2010. **29**(1): p. 1-14.
20. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: new concept for rapid sample preparation of biological fluids*. Journal of Chromatography A, 2006. **1109**(2): p. 183-190.
21. Gjelstad, A., et al., *Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields*. Journal of Chromatography A, 2007. **1157**(1): p. 38-45.
22. Gjelstad, A., et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid-liquid-liquid extraction in the 96-well format*. Bioanalysis, 2013. **5**(11): p. 1377-85.
23. UNODC. *World Drug Report 2013: New psychoactive substances (NPS)*. 2013; Available from: <https://www.unodc.org/wdr/en/nps.html>. Sett 14.03.2014.
24. Vevelstad, M., et al., *The PMMA epidemic in Norway: Comparison of fatal and non-fatal intoxications*. Forensic science international, 2012. **219**(1): p. 151-157.
25. Hovden, K., *Økende illegal omsetning av psykoaktive stoffer*. Norsk Farmaceutisk Tidsskrift, 2014(3): p. 6-15.

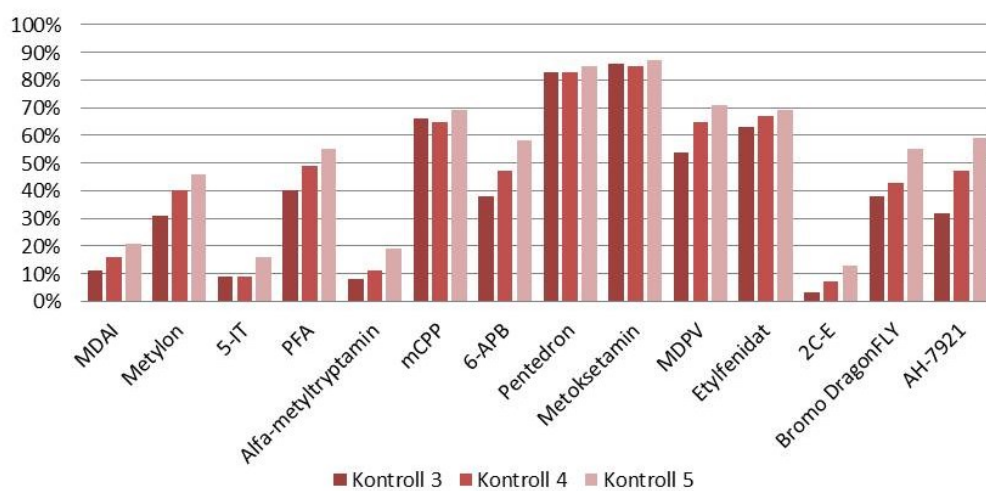
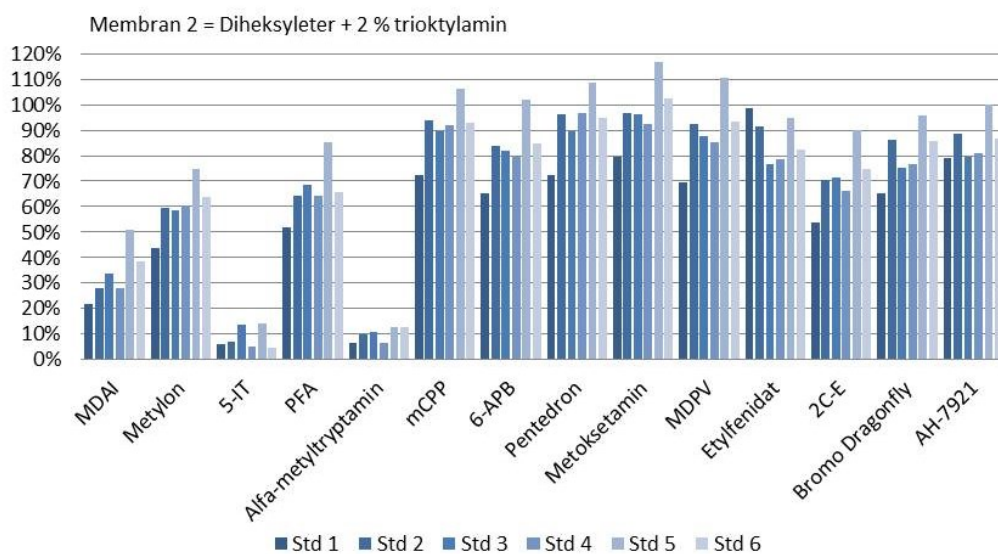
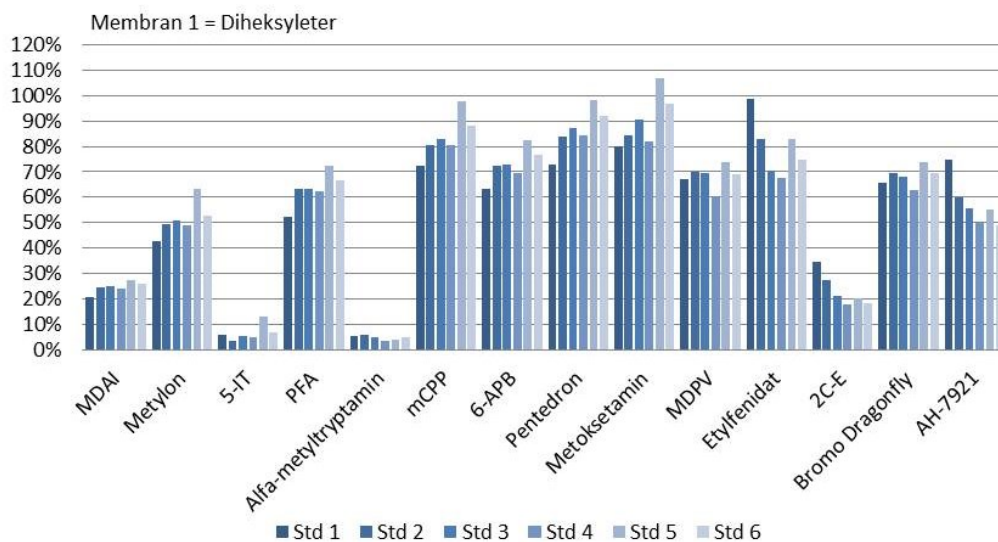
26. Maurer, H.H., *What is the future of (ultra) high performance liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry for toxicological drug screening?* Journal of Chromatography A, 2013. **1292**: p. 19-24.
27. Strano-Rossi, S., et al., *Ultra high performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry screening method for direct analysis of designer drugs, “spice” and stimulants in oral fluid.* Journal of Chromatography A, 2012. **1258**: p. 37-42.
28. Rust, K.Y., et al., *Prevalence of new psychoactive substances: A retrospective study in hair.* Drug testing and analysis, 2012. **4**(6): p. 402-408.
29. Favretto, D., J.P. Pascali, and F. Tagliaro, *New challenges and innovation in forensic toxicology: Focus on the “New Psychoactive Substances”.* Journal of Chromatography A, 2013. **1287**: p. 84-95.
30. SLV. *Høring - Oppføring av nye stoffer på narkotikalisten.* 2014; Available from: <http://www.legemiddelverket.no/Nyheter/Andre/Documents/2014-4-April/H%C3%B8ringsbrev%20april%202014.pdf>. Sett 05.05.2014.
31. Winstock, A. and C. Wilkins, *Legal highs’: the challenge of new psychoactive substances.* Transnational Inst Ser Legislative Reform Drug Pol, 2011. **16**: p. 1-16.
32. King, L. and A. Kicman, *A brief history of ‘new psychoactive substances’.* Drug testing and analysis, 2011. **3**(7-8): p. 401-403.
33. Davidson, C., *New psychoactive substances.* Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2012. **39**(2): p. 219-220.
34. SIRUS. *Syntetiske cannabinoider – et nytt «skrekkdop» på narkotikamarkedet?* 2013; Available from: <http://www.sirus.no/Syntetiske+cannabinoider+%E2%80%93+et+nytt+%C2%ABskrekkdop%C2%BB+p%C3%A5+narkotikamarkedet%3F.d25-SMRHI1-.ips>. Sett 26.03.2014.
35. Archer, R.P., R. Treble, and K. Williams, *Reference materials for new psychoactive substances.* Drug testing and analysis, 2011. **3**(7-8): p. 505-514.
36. Shulgin, A. and A. Shulgin, *PIHKAL: a chemical love story.* 1991: Transform Press.
37. Shulgin, A. and A. Shulgin, *TIHKAL: the continuation.* 1997: Transform Press.
38. EUROPOL. *About us.* Available from: <https://www.europol.europa.eu/content/page/about-us>. Sett 21.03.2014

39. UNODC. *The challenge of new psychoactive substances*. Available from: http://www.unodc.org/documents/scientific/NPS_2013_SMART.pdf. Sett 06.03.2014.
40. Lovdata, *Forskrift 14. februar 2014 nr. 199 om narkotika*. 2014.
41. Sand, O., Ø. Sjaastad, and E. Haug, *Blodet*, in *Menneskets fysiologi*. 2001, Gyldendal Norsk Forlag AS. p. 340-357.
42. Skopp, G., *Preanalytic aspects in postmortem toxicology*. Forensic science international, 2004. **142**(2): p. 75-100.
43. Folde Bårdstu, K., et al., *Supported liquid membranes in hollow fiber liquid-phase microextraction (LPME)–Practical considerations in the three-phase mode*. Journal of separation science, 2007. **30**(9): p. 1364-1370.
44. Halvorsen, T.G., et al., *Liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. Extraction from small volumes of biological samples*. Journal of separation science, 2003. **26**(17): p. 1520-1526.
45. Pedersen-Bjergaard, S., et al., *Liquid-phase microextraction of basic drugs–Selection of extraction mode based on computer calculated solubility data*. Journal of separation science, 2005. **28**(11): p. 1195-1203.
46. Ho, T.S., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction: comparison with conventional liquid–liquid extraction*. Journal of Chromatography A, 2002. **963**(1): p. 3-17.
47. Rasmussen, K.E. and S. Pedersen-Bjergaard, *Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2004. **23**(1): p. 1-10.
48. Ho, T.S., et al., *25,000-fold pre-concentration in a single step with liquid-phase microextraction*. Analytica chimica acta, 2007. **592**(1): p. 1-8.
49. Swartz, M.E., *Ultra performance liquid chromatography (UPLC): An introduction*. Separation Science Re-Defined, LCGC Supplement, 2005. **8**. p. 8-14.
50. Swartz, M.E., *UPLC™: an introduction and review*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2005. **28**(7-8): p. 1253-1263.
51. McNair, H. *The Van Deemter Equation*. 2010; Available from: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=yqegzCsHqnOxmOIIEcCzB&subNav=wnjedDsHqnOxmOIIEcCzBaF>. Sett 22.03.2014.
52. de Hoffmann, E. and V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 2007: Wiley.

53. ChemAxon. *Chemicalize.org*. Available from: www.chemicalize.org. Set 21.02.2014.
54. Peters, F.T., O.H. Drummer, and F. Musshoff, *Validation of new methods*. Forensic science international, 2007. **165**(2): p. 216-224.
55. FDA, C., *Guidance for industry: bioanalytical method validation*. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CV), 2001.
56. Gjelstad, A., et al., *Hollow-Fibre Liquid-Phase Microextraction in the Three-Phase Mode-Practical Considerations*. LC GC EUROPE, 2011. **24**(12): p. 633-+.
57. Elliott, S.P., et al., *AMT (3-(2-aminopropyl) indole) and 5-IT (5-(2-aminopropyl) indole): an analytical challenge and implications for forensic analysis*. Drug testing and analysis, 2013. **5**(3): p. 196-202.
58. Ross, E.A., et al., *Psychoactive "bath salts" intoxication with methylenedioxypyrovalerone*. The American journal of medicine, 2012. **125**(9): p. 854-858.
59. Kesha, K., et al., *Methylenedioxypyrovalerone ("Bath Salts"), Related Death: Case Report and Review of the Literature*. Journal of forensic sciences, 2013. **58**(6): p. 1654-1659.
60. Kronstrand, R., et al., *A cluster of deaths involving 5-(2-aminopropyl) Indole (5-IT)*. Journal of analytical toxicology, 2013. **37**(8): p. 542-546.
61. Meulenbelt, J., et al., *Acute MCPP intoxication: report of two cases*. Human & Experimental Toxicology, 1988. **7**(3): p. 289-292.
62. Korfmacher, W.A., *Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery*. Drug discovery today, 2005. **10**(20): p. 1357-1367.

Vedlegg

Vedlegg 1: Utbytte fra vandige (blå) og biologiske prøveløsninger (rød)



Vedlegg 2: Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte med fire ulike membranvolum og fire ulike ristetider (n=3)

		Gjennomsnittlig utbytte (n=3)					
		Membran 1			Membran 2		
		15 min.	20 min.	30 min.	15 min.	20 min.	30 min.
MDAI	2,0 µl	23 %	45 %	38 %	24 %	52 %	60 %
	2,5 µl	20 %	45 %	55 %	54 %	86 %	61 %
	3,0 µl	39 %	49 %	52 %	77 %	91 %	91 %
	3,5 µl	42 %	53 %	58 %	80 %	84 %	103 %
Metylon	2,0 µl	51 %	80 %	83 %	34 %	68 %	90 %
	2,5 µl	42 %	81 %	102 %	60 %	94 %	90 %
	3,0 µl	63 %	84 %	102 %	79 %	88 %	114 %
	3,5 µl	62 %	80 %	103 %	74 %	85 %	111 %
5-IT	2,0 µl	10 %	15 %	12 %	33 %	51 %	47 %
	2,5 µl	15 %	18 %	22 %	62 %	117 %	60 %
	3,0 µl	19 %	18 %	25 %	80 %	113 %	68 %
	3,5 µl	11 %	31 %	20 %	100 %	85 %	79 %
PFA	2,0 µl	57 %	83 %	84 %	36 %	69 %	80 %
	2,5 µl	65 %	95 %	102 %	65 %	103 %	81 %
	3,0 µl	80 %	96 %	104 %	89 %	104 %	109 %
	3,5 µl	73 %	94 %	108 %	90 %	101 %	110 %
Alfa-metyltryptamin	2,0 µl	12 %	14 %	16 %	40 %	53 %	55 %
	2,5 µl	7 %	22 %	20 %	76 %	133 %	57 %
	3,0 µl	15 %	18 %	20 %	101 %	108 %	87 %
	3,5 µl	16 %	22 %	20 %	87 %	93 %	87 %
mCPP	2,0 µl	79 %	103 %	107 %	63 %	93 %	104 %
	2,5 µl	77 %	106 %	112 %	79 %	100 %	103 %
	3,0 µl	91 %	104 %	114 %	92 %	105 %	111 %
	3,5 µl	87 %	106 %	111 %	94 %	102 %	109 %
6-APB	2,0 µl	58 %	90 %	88 %	39 %	74 %	86 %
	2,5 µl	42 %	97 %	100 %	69 %	95 %	85 %
	3,0 µl	79 %	95 %	101 %	96 %	106 %	109 %
	3,5 µl	74 %	94 %	102 %	97 %	104 %	108 %
Pentedron	2,0 µl	89 %	118 %	113 %	90 %	108 %	108 %
	2,5 µl	93 %	120 %	112 %	91 %	107 %	107 %
	3,0 µl	98 %	113 %	115 %	102 %	112 %	107 %
	3,5 µl	99 %	111 %	113 %	107 %	110 %	107 %
Metoksetamin	2,0 µl	80 %	111 %	111 %	80 %	104 %	104 %
	2,5 µl	80 %	114 %	107 %	87 %	98 %	103 %
	3,0 µl	92 %	107 %	112 %	100 %	106 %	105 %
	3,5 µl	90 %	106 %	115 %	99 %	111 %	107 %
MDPV	2,0 µl	75 %	93 %	91 %	98 %	104 %	106 %
	2,5 µl	71 %	95 %	88 %	87 %	99 %	106 %
	3,0 µl	86 %	93 %	97 %	92 %	99 %	101 %
	3,5 µl	87 %	91 %	95 %	93 %	99 %	101 %
Etylfenidat	2,0 µl	108 %	144 %	107 %	116 %	144 %	109 %
	2,5 µl	111 %	147 %	107 %	117 %	136 %	106 %
	3,0 µl	125 %	139 %	110 %	127 %	147 %	107 %
	3,5 µl	124 %	141 %	108 %	136 %	144 %	106 %

2C-E	2,0 µl	7 %	19 %	27 %	36 %	70 %	79 %
	2,5 µl	5 %	23 %	25 %	65 %	96 %	79 %
	3,0 µl	13 %	21 %	26 %	97 %	100 %	103 %
	3,5 µl	26 %	20 %	27 %	91 %	96 %	104 %
Bromo DragonFLY	2,0 µl	61 %	99 %	92 %	67 %	96 %	101 %
	2,5 µl	67 %	95 %	93 %	81 %	100 %	100 %
	3,0 µl	77 %	98 %	102 %	90 %	98 %	101 %
	3,5 µl	81 %	91 %	99 %	91 %	95 %	99 %
AH-7921	2,0 µl	59 %	87 %	80 %	97 %	105 %	104 %
	2,5 µl	58 %	86 %	74 %	88 %	65 %	103 %
	3,0 µl	78 %	84 %	88 %	95 %	97 %	97 %
	3,5 µl	83 %	80 %	90 %	92 %	96 %	102 %
Gjennomsnitt:		61 %	80 %	80 %	82 %	98 %	95 %

Vedlegg 3: Gjennomsnittlig RSD for oppnådd signalintensitet med fire ulike membranvolum og fire ulike ekstraksjonstider (n=3)

		Gjennomsnittlig RSD for signalintensiteten (n=3)					
		Membran 1			Membran 2		
		15 min.	20 min.	30 min.	15 min.	20 min.	30 min.
MDAI	2,0 µl	7 %	6 %	8 %	3 %	2 %	4 %
	2,5 µl	42 %	6 %	7 %	5 %	3 %	4 %
	3,0 µl	3 %	4 %	6 %	2 %	2 %	6 %
	3,5 µl	7 %	5 %	6 %	3 %	1 %	2 %
Metylon	2,0 µl	8 %	6 %	9 %	7 %	32 %	19 %
	2,5 µl	59 %	7 %	7 %	32 %	2 %	10 %
	3,0 µl	3 %	6 %	9 %	7 %	5 %	3 %
	3,5 µl	7 %	13 %	6 %	0 %	0 %	5 %
5-IT	2,0 µl	17 %	22 %	29 %	31 %	32 %	36 %
	2,5 µl	92 %	17 %	38 %	36 %	13 %	24 %
	3,0 µl	10 %	13 %	9 %	13 %	5 %	7 %
	3,5 µl	36 %	29 %	25 %	11 %	13 %	12 %
PFA	2,0 µl	6 %	6 %	1 %	3 %	6 %	4 %
	2,5 µl	2 %	2 %	3 %	15 %	6 %	4 %
	3,0 µl	1 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %
	3,5 µl	12 %	18 %	10 %	0 %	1 %	2 %
Alfa-metyltryptamin	2,0 µl	135 %	14 %	40 %	5 %	33 %	9 %
	2,5 µl	133 %	19 %	21 %	18 %	8 %	9 %
	3,0 µl	18 %	19 %	31 %	10 %	17 %	12 %
	3,5 µl	44 %	10 %	10 %	1 %	50 %	16 %
mCPP	2,0 µl	20 %	2 %	16 %	9 %	28 %	23 %
	2,5 µl	48 %	5 %	4 %	51 %	2 %	25 %
	3,0 µl	2 %	1 %	3 %	3 %	6 %	5 %
	3,5 µl	2 %	5 %	3 %	17 %	6 %	3 %
6-APB	2,0 µl	3 %	3 %	7 %	0 %	15 %	12 %
	2,5 µl	5 %	3 %	4 %	12 %	2 %	8 %
	3,0 µl	5 %	4 %	4 %	3 %	0 %	6 %
	3,5 µl	13 %	1 %	16 %	5 %	18 %	2 %
Pentedron	2,0 µl	27 %	7 %	17 %	21 %	38 %	26 %
	2,5 µl	41 %	3 %	2 %	51 %	1 %	27 %
	3,0 µl	5 %	1 %	3 %	2 %	5 %	2 %
	3,5 µl	2 %	1 %	28 %	2 %	2 %	3 %
Metoksetamin	2,0 µl	27 %	8 %	23 %	16 %	45 %	35 %
	2,5 µl	38 %	2 %	4 %	51 %	18 %	30 %
	3,0 µl	5 %	4 %	8 %	10 %	3 %	9 %
	3,5 µl	2 %	3 %	7 %	9 %	2 %	3 %
MDPV	2,0 µl	27 %	7 %	14 %	21 %	45 %	25 %
	2,5 µl	21 %	8 %	5 %	49 %	2 %	23 %
	3,0 µl	2 %	2 %	2 %	3 %	4 %	3 %
	3,5 µl	8 %	15 %	20 %	3 %	2 %	1 %
Etylfenidat	2,0 µl	25 %	2 %	18 %	14 %	37 %	29 %
	2,5 µl	7 %	2 %	6 %	57 %	8 %	32 %
	3,0 µl	1 %	0 %	2 %	3 %	7 %	8 %
	3,5 µl	5 %	2 %	1 %	14 %	4 %	4 %

2C-E	2,0 µl	8 %	6 %	7 %	5 %	15 %	7 %
	2,5 µl	68 %	3 %	1 %	5 %	1 %	3 %
	3,0 µl	14 %	9 %	7 %	5 %	2 %	4 %
	3,5 µl	40 %	9 %	5 %	9 %	6 %	2 %
Bromo DragonFLY	2,0 µl	17 %	6 %	20 %	8 %	43 %	20 %
	2,5 µl	23 %	3 %	4 %	43 %	6 %	20 %
	3,0 µl	2 %	3 %	5 %	2 %	7 %	9 %
	3,5 µl	1 %	8 %	4 %	5 %	1 %	1 %
AH-7921	2,0 µl	20 %	11 %	12 %	16 %	52 %	23 %
	2,5 µl	61 %	11 %	5 %	46 %	4 %	22 %
	3,0 µl	5 %	5 %	5 %	7 %	12 %	7 %
	3,5 µl	9 %	20 %	15 %	4 %	2 %	4 %
Gjennomsnitt:		22 %	7 %	10 %	14 %	12 %	12 %

Vedlegg 4: Mottakervolum og oppkonsentrering

	Konsentrasjon: 0,50 µM			Konsentrasjon: 0,25 µM		
	Topphøyde 50µl	Topphøyde 250 µl	Prosentandel 250µl / 50µl	Topphøyde 50µl	Topphøyde 250 µl	Prosentandel 250µl / 50µl
MDAI	733033	158022	22 %	269234	67211	25 %
Metylon	396670	88513	22 %	174998	36094	21 %
5-IT	5300	-	0 %	1971	-	0 %
PFA	1060976	227587	21 %	438395	109318	25 %
Alfa-metyltryptamin	9095	3251	36 %	2677	281	10 %
mCPP	3096369	642701	21 %	1301298	289596	22 %
6-APB	4395591	952730	22 %	1813884	435007	24 %
Pentedron	7916622	1573909	20 %	3402940	721396	21 %
Metoksetamin	16895111	3333118	20 %	7227626	1577197	22 %
MDPV	8290700	1445457	17 %	3273836	688919	21 %
Etylfenidat	39363867	7613055	19 %	16469328	3528935	21 %
2C-E	2017966	461895	23 %	653426	182837	28 %
Bromo DragonFLY	619216	100305	16 %	233421	53077	23 %
AH-7921	20862382	3429569	16 %	7799578	1699576	22 %
Gjennomsnitt:			20 %	Gjennomsnitt:		20 %

Vedlegg 5: Linearitetstabell fra Standard 1 (laveste standard)

Stoffnavn	Internstandard	Kalibrering	Måleområde (μM)	r^2
MDAI	¹³ C6-PMA	1/x-vekting	0,050 - 1,5	0,99
Metylon	¹³ C6-PMA	1/x-vekting	0,050 - 1,5	0,99
5-IT	¹³ C6-MDA	1/x-vekting	0,50 - 15	0,95
PFA	¹³ C6-PMA	1/x-vekting	0,05 - 1,5	0,99
Alfa-metyltryptamin	¹³ C6-PMA	1/x-vekting	0,50 - 15	0,98
mCPP	¹³ C6-PMA	1/x-vekting	0,050 - 1,5	0,99
6-APB	¹³ C6-PMA	1/x-vekting	0,050 - 1,5	0,99
Pentedron	¹³ C6-MDA	1/x-vekting	0,025 - 0,75	0,99
Metoksetamin	¹³ C6-PMA	1/x-vekting	0,025 - 0,75	0,99
MDPV	¹³ C6-MDEA	1/x-vekting	0,050 - 1,5	0,99
Etylfenidat	¹³ C6-PMA	1/x-vekting	0,025 - 0,75	0,99
2C-E	¹³ C6-2C-B	1/x-vekting	0,050 - 1,5	0,99
Bromo DragonFLY	¹³ C6-MDEA	1/x-vekting	0,050 - 1,5	0,97
AH-7921	¹³ C6-PMMA	1/x-vekting	0,025 - 0,75	0,98

Vedlegg 6: Poster fra kromatografisymposiet 2014, Sandefjord

Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction (PALME)

til analyse av nye psykoaktive stoffer i blod

Linda Vårdal^{1,2}, Stig Pedersen-Bjergaard^{1,3}, Astrid Gjelstad¹, Hilde Marie Erøy Edvardsen², Elisabeth Leere Øiestad^{1,2}

¹Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo ²Nasjonalt folkehelseinstitutt ³Institutt for Farmaci, Københavns Universitet

BAKGRUNN

Forekomst og bruk av såkalte NPS («new psychoactive substances») har tiltatt de siste årene [1]. Det internasjonale systemet for legemiddelkontroll har nå problemer med å holde tritt med utviklingshastigheten og kreativiteten bak dette fenomenet. NPS er en samlebetegnelse for stoffer som likner i struktur eller virkning på kontrollerte stoffer, men som ofte ennå ikke er underlagt regulatorisk kontroll. Flere av dem markedsføres som harmløse hverdagsprodukter, men man vet at slike NPS i noen tilfeller kan utgjøre en stor helseisiko [2]. Tiltak som kan bidra til å identifisere og stanse denne virksomheten bør prioriteres – eksempelvis nye og mer effektive rettskikologiske analyseteknikker.



HENSIKT

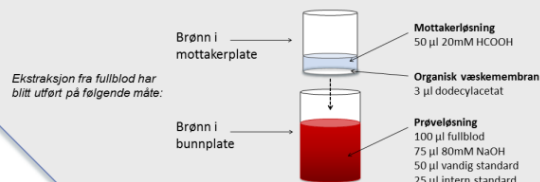
I denne studien skal den nye ekstraksjonsmetoden *Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction* (PALME) benyttes for første gang til prøveoppbehandling og analyse av noen utvalgte NPS fra fullblod. Stoffene tilhører følgende subgrupper av NPS: tryptaminer, fenetylaminer, piperaziner og syntetiske katinoner samt noen andre. Tilhørende pKa- og log P-verdier er listet opp i tabellen til høyre.

Navn:	Subgruppe:	pKa:	log P:
MDAI	Aminindan	9,96	1,11
Metylon	Katinon	7,96	1,23
5-HT	-	9,99	1,9
PFA	Fenetylamin	10,02	1,95
Alfa-metyltryptamin	Tryptamin	9,96	1,9
mCPP	Piperazin	8,87	2,15
6-APB	Fenetylamin	9,97	1,96
Pentedron	Katinon	8,20	2,58
Metoxetamin	-	8,12	2,94
MDPV	Katinon	7,31	2,99
Etylphenidat	-	9,09	2,61
2C-E	Fenetylamin	9,71	2,24
Bromo Dragonfly	Fenetylamin	9,80	2,89
AH-7921	Opioid-analog	9,48	4

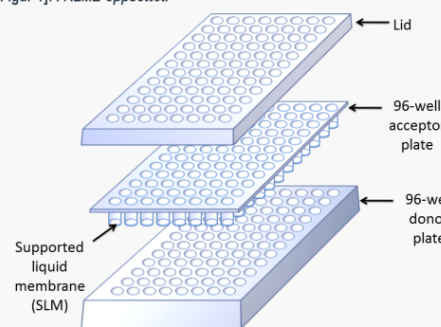
METODE

PALME er en videreføring av ekstraksjonsteknikken LPME (Liquid-Phase Microextraction) [3]. PALME utføres i et 96-brønnsformat hvor hullfiberen i HF-LPME er erstattet med flate membraner [Figur 1]. Dette muliggjør ekstraksjon av opp til 96 prøver samtidig.

Analytterne av interesse ekstraheres fra små, vandige prøvevolum, gjennom en kunstig organisk væskemembran og over til en vandig mottakerfase. Væskemembranen dannes ved å pipettere et lite volum organisk løsemiddel på det porøse materialet polyvinylidendifluorid (PVDF). Analytterne vandrer over membranen ved hjelp av en pH-gradient. pH i prøveløsningen gjøres basisk, slik at ladningen til de basiske analytterne slukkes. Dette gjør dem mer upolare og mer løselige i den organiske væskemembranen. Analytterne ioniseres etter hvert som de kommer i kontakt med den sure mottakerløsningen. Dette gjør dem mer polare og mer løselige i den vandige mottakerløsningen. Ekstraksjonen fremmes ved hjelp av risting (900 runder/min), og på grunn av gunstige faseforhold mellom prøve- og mottakerløsning får man god oppkonsentrering av stoffene som analyseres. I tillegg gir den organiske væskemembranen god opprensning, fordi de fleste matrikskomponentene ikke passerer denne. Mottakerløsningen overføres til vialer og analyseres direkte med UPLC-MS/MS.



[Figur 1]: PALME-oppsettet.



Gjelstad, A., K.E. Rasmussen, M.P. Parmer og S. Pedersen-Bjergaard (2013). "Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid-liquid extraction in the 96-well format." *Bioanalysis* 5(11): 1377-1385.

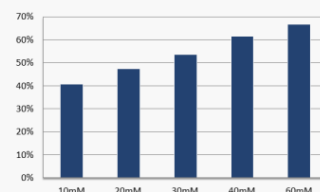
RESULTATER

Innledningsvis ble stoffene ekstrahert fra vandige prøveløsninger. Noe endring av tidligere prøvede ekstraksjonsbetingelser [3] var nødvendig for å oppnå tilfredsstillende linearitet på standardkurvene. Dette innebar økt membranvolum (fra 2 til 3 µl) og en foreløpig økning av ristetid (fra 15 til 45 minutter) for å sikre ekstraksjonslikevekt. Standardkurvene ga tilhørende r^2 -verdier på over 0,99 for alle stoffene. Utbyttene lå mellom 23-90% med relative standardavvik mellom 3-7%. Optimalisert ekstraksjonstid er foreløpig ikke bestemt.

Utbyttene ved ekstraksjon fra fullblod ligger i området 16-119%, med relative standardavvik på under 7% for de fleste stoffene. Resultatene fra første ekstraksjon viste en mulig sammenheng mellom pKa-verdi og utbytte; jo høyere pKa-verdi, jo lavere utbytte. Dette ble undersøkt ved å tilsette økende molare konsentrasjoner av NaOH i prøveløsningen.

pH i prøveløsning ved ekstraksjon fra fullblod:

Ekstraksjon med økende mengde molar konsentrasjon NaOH i prøveløsningen viste seg å være utslagsgivende for utbyttet ved ekstraksjon fra fullblod. I et første forsøk ble konsentrasjonene 10mM, 20mM, 30mM, 40mM og 60mM testet. Da utbyttet ikke viste noe tegn til stagnering ble det utført et nytt forsøk med to nye konsentrasjoner: 80mM og 100mM. [Figur 2] viser den tydelige økningen i utbytte i det første forsøket. Det andre forsøket viste en økning i utbytte opp til 80mM, men lite endring fra 80mM til 100mM.



[Figur 2]: Gjennomsnittlig utbytte ved økende molar konsentrasjon NaOH i prøveløsning.

KONKLUSJON

- PALME er en enkel og effektiv metode som gir god opprensning og oppkonsentrering
- PALME kan benyttes til prøveoppbehandling og analyse av de aktuelle NPS fra fullblod, og vil følgelig kunne benyttes i rettskikologisk sammenheng i fremtiden
- pH i prøveløsning er utslagsgivende for utbyttet ved ekstraksjon fra fullblod

[1] UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime). "World Drug Report 2013: New Psychoactive Substances". URL: <https://www.unodc.org/wdr/en/nps.html>
 [2] Vævelstad, M., Øiestad, E. L., Middelkoop, G., Hasvold, L., Lilleg, P., Delaviers, G. J. M. et al. (2012). "The PMMA epidemic in Norway: Comparison of fatal and non-fatal intoxications." *Forensic Science International*, 219.
 [3] Gjelstad, A., Rasmussen, K. E., Parmer, M. P. og Pedersen-Bjergaard, S. (2013). "Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid-liquid extraction in the 96-well format." *Bioanalysis* 5(11): 1377-1385.